Aus dem Hygiene–Institut der Universität Tübingen
Direktor: Professor Dr. med. R.–E. Bader

KOMPLEXBILDUNG DER ANTIBIOTIKA CEPHALOTHIN, CEPHRADIN, CEPHACETRIL, CEFAZOLIN, CEPHALEXIN UND CEPHAMANDOL MIT EIWEISSKÖRPERN DES HUMANSERUMS

INAUGURAL – DISSERTATION
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der Medizinischen Fakultät
(Theoretische Medizin)
der Eberhard–Karls–Universität
zu Tübingen

vorgelegt von
FRIDO EBERHARD MÜTSCH
aus Aalen/Württemberg

1979

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41548919_0010

Aus dem Hygiene–Institut der Universität Tübingen
Direktor: Professor Dr. med. R.–E. Bader

KOMPLEXBILDUNG DER ANTIBIOTIKA CEPHALOTHIN, CEPHRADIN, CEPHACETRIL, CEFAZOLIN, CEPHALEXIN UND CEPHAMANDOL MIT EIWEISSKÖRPERN DES HUMANSERUMS

INAUGURAL – DISSERTATION
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der Medizinischen Fakultät
(Theoretische Medizin)
der Eberhard–Karls–Universität
zu Tübingen

vorgelegt von
FRIDO EBERHARD MÜTSCH
aus Aalen/Württemberg

1979

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Dekan:	Professor Dr. med. H. J. Mallach
1. Berichterstatter:	Professor Dr. med. U. Ullmann
	(Professor Dr. med. R. E. Bader)
2. Berichterstatter:	Professor Dr. med. H. Breuninger

gedruckt bei H.J.Köhler, Reprografischer Betrieb , Tübingen,Neue Str.11

I N H A L T

		Seite
I.	E i n l e i t u n g	3
II.	M a t e r i a l u n d M e t h o d e	5
A	Gelfiltration unter Gleichgewichtsbedingungen	5
B	Gelfiltration unter den Bedingungen der Frontalanalyse	6
C	Wirkungsverlust während der Versuchsdauer	7
D	Vergleich der antibakteriellen Aktivität einer Cephalosporin-Antibiotikum-Pufferlösung mit und ohne Humanserum	8
E	Membranultrafiltration durch Zentrifugation: Centriflo	8
F	Membranultrafiltration durch Gasdruck: Diaflo	10
G	Nachweis der antibakteriellen Wirksamkeit	11
H	Spektralphotometrie von Cefazolin und Cephacetril	12
I	Gewinnung des Serums und Herstellung des Lyophilisats	13
K	Bestimmung der Gesamteiweißkonzentration im Serum	13
L	Bestimmung von individuellen Schwankungen der Eiweißbindung	13
M	Substanzen und Geräte	13
III.	E r g e b n i s s e	16
A	Komplexbildung von Antibiotika mit Eiweißkörpern	16
	Cephalothin	17
	Cephradin	21
	Cefazolin	24
	Cephacetril	28
	Cephalexin	31
	Cephamandol	35

B	Einfluß der Zusammensetzung des Nähragars	39
C	Einfluß von Humanserum auf das Bakterienwachstum	39
D	Spektralphotometrie von Cefazolin und Cephacetril	39
E	Individuelle Schwankungen der Proteinbindung im Serum von Patienten	43
IV.	D i s k u s s i o n	45
V.	Z u s a m m e n f a s s u n g	75
VI.	L i t e r a t u r	78

I. Einleitung

BENNHOLD und Mitarbeiter (5) untersuchten die Fähigkeit der Plasmaproteine die verschiedensten Stoffe an sich zu binden. Sie faßten den Begriff der Eiweißbindung sehr weit und definierten ihn als "jedes Haften am kolloidalen Eiweißteilchen". In diesen Untersuchungen wurden Bindungen zwischen den Eiweißkörpern des Blutplasmas und physiologischen Blutbestandteilen wie Wasser, Bilirubin, Porphyrinen, Cholesterin, Harnsäure, Phenolen und Kresolen (bei urämischen Patienten), Magnesium-, Calcium- und Eisenionen, sowie diversen Hormonen und Vitaminen ermittelt. Auch zahlreiche Fremdstoffe ließen sich an Serumeiweiße gebunden nachweisen, darunter saure, basische und neutrale Farbstoffe, sowie eine damals unerwartete Zahl von Medikamenten. Diese Ergebnisse führten Bennhold zu der Vermutung, die Eiweißbindung sei vielleicht eine Vorbedingung für die Brauchbarkeit eines Stoffes als Arzneimittel (5).
Die moderne Pharmakologie unterstützt zumindest für einen Teil der gebräuchlichen Medikamente diese Theorie.

Die Plasmaproteine haben drei wichtige Aufgaben: Transport-, Depot- und Pufferfunktion. Die Transportfunktion ist verantwortlich für die Verteilung des Medikamentes im gesamten Gefäßsystem, unter Depotfunktion versteht man die Fähigkeit der Proteine, gebundenes Antibiotikum in dem Maße wieder freizusetzen, wie freies Antibiotikum aus dem Gleichgewicht verschwindet. Durch ihre Pufferfunktionen ermöglichen Serumeiweiße, daß ein konstanter, wirksamer Spiegel der gebundenen Substanz über eine längere Zeit aufrecht erhalten werden kann. Ohne diese Funktion der Plasmaproteine gäbe es wahrscheinlich nur wenige brauchbare Medikamente, da der

Blutspiegel ohne diese Nivellierung ständig zwischen unwirksamen und toxischen Konzentrationen schwanken würde (31).
Nach neuerer Ansicht (34) handelt es sich bei der Proteinbindung um ein dynamisches Geschehen, bei dem eine stets gleichbleibende Menge einer Substanz im ungebundenen Zustand vorliegt.
Nicht unter den Begriff "Komplexbildung mit Eiweißkörpern" werden hier irreversible Bindungen von Substanzen an Proteine, wie sie zum Beispiel bei alkylierenden Zytostatika oder manchen Karzinogenen (16) vorkommen, gerechnet. Auch Bildungen von Protein-Antibiotikum-Komplexen, wie sie beim Zustandekommen einer Allergie auftreten, sind nicht Gegenstand dieser Untersuchung.

Die Bedeutung der Eiweißbindung für Chemotherapeutika und Behandlung ist noch ungeklärt. Auch ein Verfahren zur Bestimmung der Eiweißbindung konnte nicht vereinbart werden, da heute noch keine Methode bekannt ist, die, wie ein Maßband bei der Längenmessung, genaue, richtige und zuverlässige Resultate ergibt.
Gegenstand der eigenen Untersuchungen ist es, rasch und einfach durchzuführende Ultrafiltrationsverfahren mit herkömmlichen Gelfiltrationen zu vergleichen. Gleichzeitig soll die Eiweißbindung für Cephalosporin-Antibiotika ermittelt werden mit allen hier verfügbaren Verfahren, so daß der Umfang methodisch bedingter Unterschiede erfaßt und zum Vergleich von Literaturwerten genützt werden kann.

II. Material und Methode

A. Gelfiltration unter Gleichgewichtsbedingungen

Zur Untersuchung der Eiweißbindung der Antibiotika eignen sich grundsätzlich die gleichen Methoden, die auch zur Bestimmung der Wechselwirkungen anderer Stoffe mit Proteinen gebräuchlich sind.
Die Methode der Gelfiltration wurde bereits früher ausführlich beschrieben und ihre Anwendbarkeit begründet (9, 11, 24). Sie wurde in der von JUNGE (25) und ULLMANN (62) beschriebenen Modifikation durchgeführt.
Ein Chromatographierohr mit einem Durchmesser von 2 cm wurde bis zu einer Schichthöhe von 20 cm mit Sephadex G-25 Fine gefüllt. Anschließend wurde die Säule 2,5 Stunden lang mit mehr als 300 ml phosphatgepufferter Kochsalzlösung (pH 7,2), welche das Antibiotikum in der dem folgenden Versuch entsprechenden Konzentration enthielt, gespült.
2 ml lyophilisiertes Serum wurden in jeweils 2 ml Antibiotikum-Puffer-Lösung aufgenommen und 30 Minuten im Brutschrank bei 37 °C inkubiert. Um das antibiotikumhaltige Serum von Schlieren und anderen Bestandteilen zu reinigen, die zu einer Verklebung der Sephadexsäule und damit zu einer unkontrollierbaren Änderung der Durchflußgeschwindigkeit führen könnten, wurde es 10 Minuten bei 4500 U/min zentrifugiert.
1 ml des gereinigten Serums wurde vorsichtig mit einer Pipette auf die Sephadexsäule gebracht. Nach dem Einsickern wurde vorsichtig, und ohne das Gelbett aufzuwirbeln, Antibiotikum-Puffer-Lösung aus der Elutionsflüssigkeit aufpippetiert. Durch eine Mariottesche Flasche wurde die Elution konstant gehalten.

Die Gleichgewichtsgelfiltration erfolgte mit einem Durchfluß von 15 ml/cm^2/h und einem durchflußwirksamen Druck von 10 cm Wassersäule. Als Versuchstemperatur wurde die Raumtemperatur von 20 °C gewählt, da keine Unterschiede in der Eiweißbindung bei 20 und 37 °C gefunden werden konnten (25).
Das Eluat wurde an einem Durchflußphotometer vorbeigeführt, seine Transmission bei 254 nm gemessen, und in Portionen von 1,5 ml einem Fraktionssammler zugeleitet. Ein Fallbügelschreiber registrierte die Transmission und zeigte durch Farbwechsel die Fraktionsänderung an. In den zuerst erscheinenden Eluatportionen finden sich Eiweiß und an Eiweiß gebundenes Antibiotikum, erst dann folgt das freie Antibiotikum.
Das Photometer zeigt den Durchfluß der eiweißhaltigen Fraktionen mit einem charakteristischen Signal an. Drei Fraktionen vor und 30 bis 50 Fraktionen nach diesem Signal wurden auf ihren Gehalt an biologisch aktiven Cephalosporinantibiotika im Agardiffusionstest untersucht. Es wurden von jeder Fraktion drei sterile Filterpapiertestblättchen (Durchmesser 9 mm) mit je 0,02 ml Eluat getränkt. Nach 15 Minuten Trocknung bei Zimmertemperatur wurden die Testblättchen unter sterilen Kautelen auf zwei Petrischalen (Durchmesser 9 cm) gebracht, welche mit je 5 ml Bacillus-subtilis-Agar (7500 Sporen/ml Agar) beschickt waren. Ein Testblättchen wurde zentral in die eine, die beiden anderen symmetrisch in die andere Schale gelegt.

B. Gelfiltration unter den Bedingungen der Frontalanalyse

Das Chromatographierohr (siehe Seite 5) wurde bis zu einer Schichthöhe von 20 cm mit Sephadex G-25 Fine gefüllt und dann mindestens 8 Stunden mit phosphatgepufferter Kochsalzlösung äquilibriert.
Das in Portionen zu 40 ml lyophilisierte Serum wurde in

40 ml der Antibiotikum-Puffer-Lösung aufgenommen und 30 min bei 37 °C inkubiert. Bestandteile des Serums, die möglicherweise die Säule verstopft hätten, wurden durch Zentrifugation (10 min bei 4500 U/min) oder Filtration abgetrennt.
Das gereinigte antibiotikumhaltige Serum wurde auf die Sephadexsäule pipettiert, nach seinem Einsickern wurde das Gelbett mit phosphatgepufferter Kochsalzlösung überschichtet und mit der Mariotteschen Flasche verbunden.
Die Durchflußgeschwindigkeit betrug 15 ml/cm^2/h bei einem durchflußwirksamen Druck von 10 cm Wassersäule. Sie sank jedoch um 20-30 % in der Phase, in der die gesamte Serummenge über das Gel verteilt war. Messung der Transmission, Registrierung und Fraktionierung erfolgten wie unter II. A beschrieben. Vom Beginn des Eiweißsignals an wurden mindestens 60 Fraktionen nach dem Agardiffusionsverfahren auf ihren Gehalt an antibakteriell wirksamer Substanz untersucht.

C. Wirkungsverlust während des Versuchs

Als Elutionsflüssigkeit bei der Gleichgewichtsgelfiltration dient eine Lösung von Antibiotikum in Phosphatpuffer. Die Konzentration des Antibiotikums im Serum ist genau gleich und entspricht den im menschlichen Serum nach Gabe mittlerer therapeutischer Dosen ermittelten Spiegeln. Es wurden jeweils mehrere Testblättchen vor Beginn und nach Beendigung des Versuches mit dieser Elutionsflüssigkeit getränkt. Im nachfolgenden Agardiffusionstest läßt sich eine gegebenenfalls eintretende Minderung der antibakteriellen Wirksamkeit an der Verringerung der Hemmhofdurchmesser ablesen.

D. Vergleich der antibakteriellen Aktivität einer Cephalosporinantibiotikum-Puffer-Lösung mit und ohne Humanserum

Die Antibiotikum-Puffer-Lösung wurde durch Einwaage von Antibiotikumtrockensubstanz in phosphatgepufferte physiologische Kochsalzlösung hergestellt. Ein kleiner Teil dieser Lösung wurde zur Aufnahme des lyophilisierten Serums verwendet. Es wurden mehrfach Agardiffusionstests mit beiden Lösungen durchgeführt, um Abnahmen von antibakterieller Aktivität durch bloße Anwesenheit von Serum erkennen zu können.

Abtrennung des an Eiweiß gebundenen Antibiotikums durch Ultrafiltrationsverfahren

Bei der Ultrafiltration handelt es sich um ein Verfahren zur Konzentrierung, Reinigung, Entsalzung und Fraktionierung von makromolekular gelösten Stoffen (59). Die Eignung dieses Verfahrens für Bindungsstudien wurde von BLATT, ROBINSON und BIXLER (8) hervorgehoben, die ein mathematisches Modell anhand von Ultrafiltrationsexperimenten mit Calcium und Methylorange, gebunden an 4- und 8-prozentiges Human-Serumalbumin, entwickelten.

E. Membranultrafiltration durch Zentrifugation: Centriflo-Verfahren

Das Centriflo-Verfahren eignet sich besonders zur schnellen Erzeugung von proteinfreien Filtraten und Proteinkonzentraten aus verschiedenen Lösungen. Innerhalb weniger Minuten können diese Trennungen in vielen gebräuchlichen Laborzentrifugen durchgeführt werden. Centriflo-Membranultrafilter sind konusförmige Membranen mit einem Fassungsvermögen von bis zu 7 ml.

Der verwendete CF 50 Konus hält Moleküle mit einer Molekülmasse von mehr als 50 000 zurück, während kleinere Partikel, Wasser und Lösungsmittel ungehindert passieren. Der Centriflo-Membrankegel befindet sich in einem leichten konischen Träger aus nicht porösem Kunststoff mit einer kleinen Öffnung am Konusboden. Dieser Konus wird in ein Zentrifugenglas aus Kunststoff gesetzt, wie es in einer gebräuchlichen Laborzentrifuge verwendet werden kann (2 a).
Nach einstündiger Vorbehandlung in destilliertem Wasser oder in proteinfreier Antibiotikum-Puffer-Lösung werden Ultrafilter, Träger und Zentrifugenglas zusammengefügt, mit antibiotikumhaltigem Serum oder mit Puffer beschickt und 30 Minuten bei 2500 U/min zentrifugiert. Das Serum-Antibiotikum-Gemisch wurde zuvor, wie in allen Ansätzen, 30 Minuten bei 37 °C inkubiert. Eine vorherige Reinigung wie bei der Gelfiltration erfolgte nicht. Durch die Zentrifugalkraft sammelt sich am Boden des Zentrifugenglases ein eiweißfreies Ultrafiltrat. Im Agardiffusionstest wird dessen antibakterielle Wirksamkeit untersucht. Die prozentuale Eiweißbindung wird ermittelt aus der Differenz der Hemmhofdurchmesser: Antibiotikumhaltiges Serum vor Zentrifugation und Ultrafiltrat. Um eine Inaktivierung des Antibiotikums durch Serum auszuschließen, wurde stets der Hemmhofdurchmesser einer eiweißfreien Antibiotikum-Puffer-Lösung mitgemessen. Absorptionen in den Ultrafiltern wurden dadurch erkannt, daß mit jedem Serum ein Antibiotikum-Puffer-Gemisch mitzentrifugiert und im Agardiffusionstest untersucht wurde.

F. Membranultrafiltration durch Gasdruck: das Diaflo-Verfahren

Die hier verwendeten Diaflo-Ultrafilter bestehen aus synthetischen Polymeren. Sie sind asymmetrisch aufgebaut und wirken als Molekularfilter, wie Untersuchungen von PREUSSER (46) an XM 50 und XM 100 Membranen ergeben haben. Die glänzende Seite zeigt eine größere Porenanzahl, der Anteil der Porenfläche an der Filterfläche liegt jedoch unter 0,6 %. Auf der matten Seite befinden sich in größeren und unregelmäßigen Abständen rundliche poröse Bereiche, aus denen sich mehrere filtrationswirksame Maxima ergeben. Daraus leitet sich die Funktion der glatten Seite als abscheidungswirksame Oberflächenschicht her. Die Filtrationseigenschaften hängen damnach also entscheidend von der Durchflußrichtung des Filtrats ab (46). Die Membranen enthalten keine oberflächenaktiven Bestandteile, die mit Proteinen reagieren können (2 a).

UM 2 Membranen halten Makromoleküle mit einem Molekulargewicht von mehr als 1000 zurück. Sie enthalten jedoch in ihrer Polymerstruktur Spuren ionischer Bestandteile und eignen sich daher nicht für das Studium von Bindungen, in denen stark koordinierte Ionen enthalten sind. PM 30 Membranen haben dagegen eine völlig inerte, nicht ionische Grundstruktur; ihre Abtrenngrenze liegt bei einem Molekulargewicht von 30 000 (2 a).

Verwendet werden diese Membranen im Mikroultrafiltrationssystem 8 MC der Firma Amicon. Dieses Gerät besteht aus einer Ultrafiltrationszelle mit batteriebetriebenem Rührer, einem Behälter für zusätzliche Versuchslösung und einem Ventil zum Umschalten von Diafiltration auf Konzentration. Die Zelle besteht aus Plexiglas und anderen biologisch inerten Kunststoffen (2 a).

Die Abtrennung der an Eiweiße gebundenen Fraktion der Antibiotika wurde für alle sechs Präparate mit PM 30 Membranen mit und ohne Äquilibrierung der Membranen durchgeführt. Cephalexin wurde zusätzlich mit UM 2 Membranen mit und ohne Äquilibrierung untersucht. Die Diafiltrationen wurden bei Zimmertemperatur durchgeführt. Die Membran wurde in das Gerät eingesetzt und mit Vaseline abgedichtet, die Zelle mit 2 ml antibiotikumhaltigem Serum beschickt. Dann wurde bei 2-2,5 at Stickstoff und mittlerer Rührerdrehzahl 30 Minuten lang filtriert. Das Ultrafiltrat wurde während dieser Zeit gesammelt. Anschließend wurden jeweils 4 Portionen à 0,02 ml im Agardiffusionstest auf antibakterielle Wirksamkeit geprüft.
Die Membranen werden 1 Stunde vor Gebrauch in destilliertes Wasser oder in entsprechende Antibiotikum-Puffer-Lösungen gelegt (51, Äquilibrierung). Sie wurden nach der vom Hersteller vorgeschriebenen Reinigung mehrfach verwendet (2 b). Wie bei allen anderen Versuchen wurde das Serum-Antibiotikum-Gemisch vor der Auftrennung 30 Minuten bei 37 °C im Brutschrank inkubiert.

G. Nachweis der antibakteriellen Wirksamkeit

Der Nachweis der antibakteriellen Wirksamkeit der Cephalosporinantibiotika erfolgte im Agardiffusionstest. Als Testbakterium diente Bacillus subtilis ATCC 66 33. In 500 ml heißem Nähragar, bestehend aus 2/3 Mueller-Hinton- und 1/3 DST-Agar, wurden 12,5 ml einer 3×10^5 Sporen/ml enthaltenden Suspension pipettiert und gründlich vermischt, so daß 1 ml Agar im Durchschnitt $7,5 \times 10^3$ Sporen enthielt.
In Petrischalen mit einem Durchmesser von 9 cm wurden jeweils 5 ml dieses Sporenagars pipettiert und gleichmäßig verteilt. Dank der günstigen Diffusionsverhältnisse in der geringen Agarmenge können so auch schon geringe

Antibiotikamengen anhand ihrer Hemmhofbildung erkannt und bestimmt werden. Auf Filterpapiertestblättchen mit 9 mm Durchmesser wurden mit einer Eppendorfpipette 0,02 ml der zu untersuchenden Flüssigkeit gebracht. Nach 15 Minuten Trocknung bei Zimmertemperatur und 30 Minuten Vordiffusion bei 4 °C wurden die Platten 18 Stunden bei 37 °C bebrütet. Danach konnten vor dunklem Hintergrund die Durchmesser scharf abgerenzter Hemmhöfe auf Bruchteile von Millimetern genau abgelesen werden (25, 62).
Der Durchmesser des Hemmhofes ist direkt proportional zur Konzentration der antibakteriell wirksamen Substanz, wenn Menge und Zusammensetzung des Agars, Anzahl der Sporen und Vordiffusionszeit konstant gehalten werden (44).
Die Antibiotikumkonzentrationen wurden anhand von Eichkurven ermittelt, welche zuvor mit genau eingewogenen Antibiotikummengen oder durch entsprechende Verdünnungsreihen aufgestellt worden waren.

H. Spektralphotometrie von Cefazolin und Cephacetril

Bei der Äquilibrierung der Sephadexsäule für die Gelfiltration unter Gleichgewichtsbedingungen mit Cefazolin fiel die erhebliche Änderung der Transmission bei 254 nm gegenüber phosphatgepufferter Kochsalzlösung auf. Um die Lichtabsorption des Cefazolin und nachfolgend auch des Cephacetril genau zu bestimmen, wurde je eine spektralphotometrische Untersuchung in Puffer und im Urin eines gesunden Probanden durchgeführt. Dazu wurde eine Verdünnungsreihe von 60-54-48-...-1-0,5-0,25 µg/ml Antibiotikum in Puffer respektive Urin hergestellt. Die Transmission wurde gemessen und registriert im Bereich von 360-180 nm bei Urin und von 300-180 nm bei Puffer. Der Wellenlängenvorschub war 50 nm/min, der des Schreibers 1,0 inches/min.

Für Urin wurde zuerst eine Transmissionskurve ohne Antibiotikumzusatz geschrieben. Die Spektralphotometrie mit Cefazolin wurde im Urin bei Konzentrationen von 60 µg/ml, mit Cephacetril bei 1000 µg/ml registriert.

I. Gewinnung des Serums und Herstellung des Lyophilisats

Aus Frischblutkonserven, die für die Verwendung beim Menschen kurz zuvor verfallen waren, wurde das Serum abzentrifugiert, in Portionen von 4o ml für die Frontalanalyse respektive 2 ml für die übrigen Bestimmungen abgefüllt, im Methanolbad von -60 °C eingefroren und sofort gefriergetrocknet. Die Lagerung der lyophilisierten Seren erfolgte bei -20 °C.

K. Bestimmung der Gesamteiweißkonzentration im Serum

Die Bestimmung des Gesamteiweißes im Serum erfolgte nach der Biuretmethode (48).

L. Bestimmung von individuellen Schwankungen

Um Schwankungen der Bindung von Antibiotika an die Proteine von Seren verschiedener Individuen zu erkennen, wurden 20 Serumproben, die zufällig aus dem Tagesprogramm des klinischen Labors der Medizinischen Poliklinik der Universität Tübingen ausgewählt worden waren, auf ihre Bindungsfähigkeit für Cephalothin 10 µg/ml mit dem Centriflo-Verfahren ohne Äquilibrierung untersucht.

M. Substanzen und Geräte

Verwendete Antibiotika
Cephalothin, Charge-Nr. AXP 5AB 97, Aktivität 100 % (Firma Lilly GmbH, Gießen); Cephradin, Charge-Nr. 4 G 1343, Aktivität 100 % (Firma van Heyden GmbH, Regens-

burg); Cefazolin, Charge-Nr. 715886, Aktivität 95,4 % (Firma Boehringer, Mannheim); Cephacetril, Charge-Nr. 02/542/2, Aktivität 90,9 % (Firma Ciba-Geigy, Wehr/Baden); Cephalexin, Charge-Nr. 8 DH 06, Aktivität 95 % (Firma Lilly GmbH, Gießen); Cephamandol, Chargen-Nr. SI76-4B und SI76-5C, Aktivität 90,6 %, beziehungsweise 91,1 % (Firma Lilly, Indianapolis, USA).

Die Proteinbestimmung erfolgte mit dem Eiweißpack der Firma ASAL, Präzisionschemikalien. Für Gelfiltrationsexperimente wurde Sephadex G-25 Fine (Pharmacia Fine Chemicals AB, Uppsala, Schweden) verwendet.

Für die Membranultrafiltration durch Zentrifugation wurden Centriflo Membrane Cones, Typ 224 CF 50 verwendet (Amicon Corporation, Lexington, USA). Die Membranultrafiltration nach dem Diaflo-Verfahren wurde mit Filtern des Typs PM 30 für alle Antibiotika durchgeführt, sowie für Cephalexin zusätzlich mit UM 2 Membranen.

Zur Gelfiltration wurde ein 30 cm langes Chromatographierohr mit einem inneren Durchmesser von 2 cm, ein Durchflußphotometer (Uvicord Type 4107 A, Wellenlänge 254 nm) und ein Fraktionssammler (Ultrorac 7000) verwendet (Firma LKB Produkter, Schweden). Der konstante Zufluß war durch eine Mariottesche Flasche gewährleistet. Die Centriflo Membrane Cones wurde in einer Beckman Kühlzentrifuge, Modell J 21 eingesetzt (Beckman Instruments, München). Die Membranultrafiltration nach dem Diaflo-Verfahren wurde mit dem Micro-Ultrafiltrationssystem Modell 8 MC (Amicon Corporation, Lexington, USA) durchgeführt. Zur Spektralphotometrie wurde ein Beckman Spectrophotometer DB-G in Verbindung mit einem 10 " Recorder (Beckman Instruments, München) verwendet.

Für die Agardiffusionstests wurde ein Gemisch verwendet, das aus 1/3 DST- und 2/3 Mueller-Hinton-Agar (Oxoid, London) bestand und 75 00 Sporen von Bacillus subtilis ATCC 6633 je Milliliter Agar enthielt.
Die Filterpapiertestblättchen, Durchmesser 0,9 cm, wurden von der Firma Schleicher & Schüll, Dassel, bezogen.

III. Ergebnisse

A. Komplexbildung mit Eiweißkörpern

Alle sechs Cephalosporin-Antibiotika wurden mit den beiden Gelfiltrationsmethoden und den vier Membranultrafiltrationsverfahren untersucht. Die Gelfiltration unter Gleichgewichtsbedingungen gelang nicht mit Cephalexin 5 µg/ml, obwohl sie bei allen anderen Antibiotika und Konzentrationen Ergebnisse geliefert hatte. Die Frontalanalyse führte bei Cephacetril 15 µg/ml nicht zu Erkenntnissen über die Eiweißbindung. Beschränkt anwendbar erwiesen sich auch die Membranultrafiltrationen nach dem Centriflo- und nach dem Diaflo-Verfahren bei Cephradin und Cephalexin.

Bei allen untersuchten Cephalosporin-Antibiotika zeigte sich eine mehr oder weniger deutliche Abhängigkeit der Proteinbindung von der Konzentration des Antibiotikums im Serum. Besonders deutlich ist dieses Phänomen bei Cephalothin, Cephamandol und Cephradin, etwas weniger deutlich bei Cefazolin.
Die Äquilibrierung der Membranultrafilter führt zu bedeutsamen Unterschieden der Eiweißbindung bei Cephalothin 10 und 5 µg/ml, Cephalexin 15 µg/ml, sowie Cephamandol 10 und 5 µg/ml im Diaflo-Verfahren, bei Cephradin 30 und 10 µg/ml, Cefazolin 60 und 30 µg/ml, Cephacetril 30 µg/ml und Cephamadol 10 und 5 µg/ml im Centriflo-Verfahren. Nach der Äquilibrierung ergibt sich ein geringerer Zahlenwert für die Eiweißbindung, oder es wird eine Anreichung von antibakteriell wirksamer Substanz im Ultrafiltrat vermieden wie bei Cephradin. Sinn dieser Äquilibrierung ist, eine eventuelle Aufsättigung der Membran durch Absorption von Anti-

biotika vorwegzunehmen, um keine zu hohen Zahlenwerte für die Eiweißbindung zu erhalten, beziehungsweise Absorptionsphänomene aus dem Vergleich von Eiweißbindungsbestimmungen mit und ohne Äquilibrierung zu erkennen.
Außerordentlich starke und damit das Ergebnis beeinträchtigende Absorptionen bei den Gelfiltrationsexperimenten mit Sephadex wurden bei der Untersuchung von Cephacetril gefunden. Ähnliche Effekte in geringerem Ausmaß traten bei Gelfiltrationen mit Cephalothin und Cephradin auf. Noch merkliche Absorptionen fanden sich bei Cefazolin und Cephamandol. Keinerlei Aktivitätsverlust ließ sich dagegen bei der Frontalanalyse von Cephalexin erkennen.

Cephalothin

Die Gleichgewichtsgelfiltration ergab bei der Konzentration 10 µg/ml eine Verminderung des Hemmhofdurchmessers im Agardiffusionstest von 36 auf 31,4 mm, was einer Eiweißbindung von 37 % entspricht (Abbildung 1). Bei der Frontalanalyse lag das zweite Plateau mit 28,8 mm um 2,8 mm unter dem ersten, entsprechend einer Eiweißbindung von circa 53 % (Abbildung 2).

Abbildung 1:

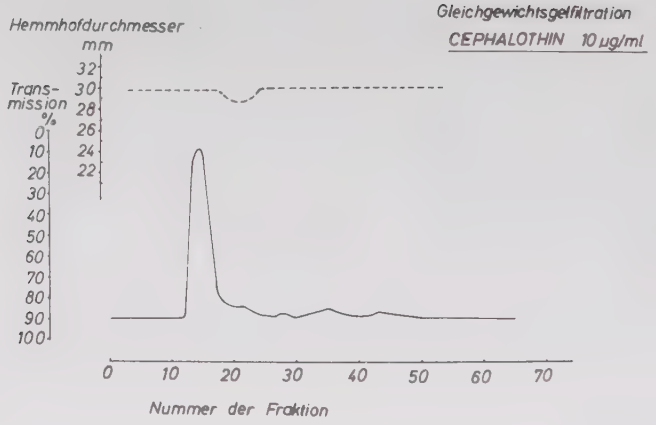
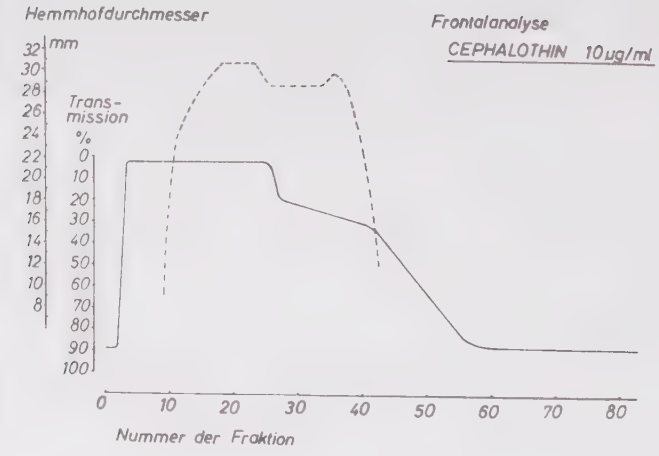
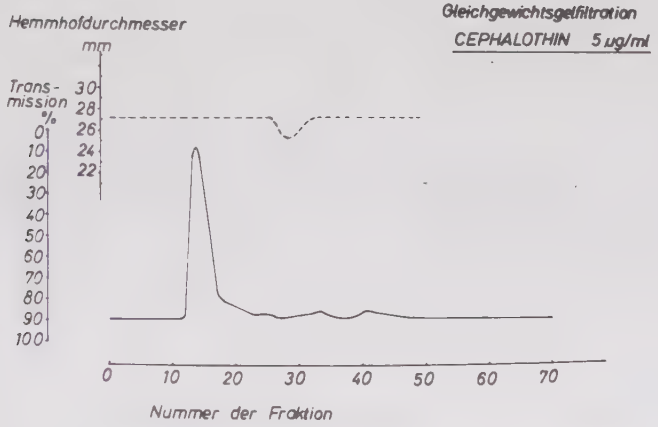


Abbildung 2:



Bei der Konzentration von 5 µg/ml ergab die Gleichgewichtsgelfiltration 34 % (Abbildung 3) und die Frontalanalyse (Abbildung 4) 46 % gebundenes Cephalothin.

Abbildung 3:



Die Ergebnisse der Membranultrafiltrationen sind in Tabelle 1 zusammengefaßt. Der Mittelwert beträgt für Cephalothin 51,5 % (10 µg/ml), die Grenzwerte sind 37 % und 63 %. 5 µg/ml Cephalothin werden zwischen 33 % und 60 % an Eiweiß gebunden, im Mittel 45,8 %. Die Ergebnisse des Diaflo-Verfahrens werden durch die Äquilibrierung deutlich verändert.

Abbildung 4:

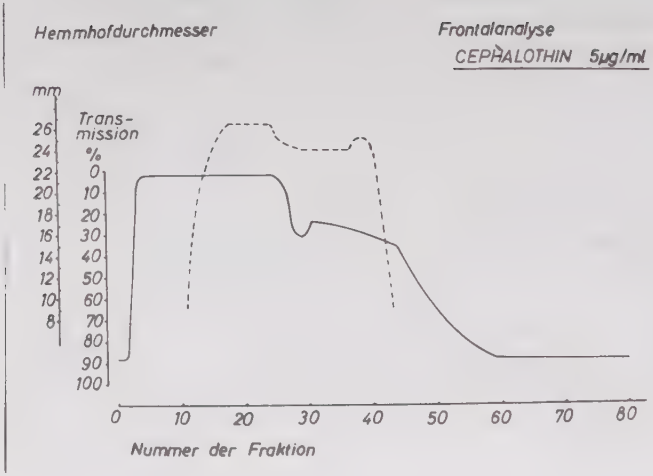


Tabelle 1:

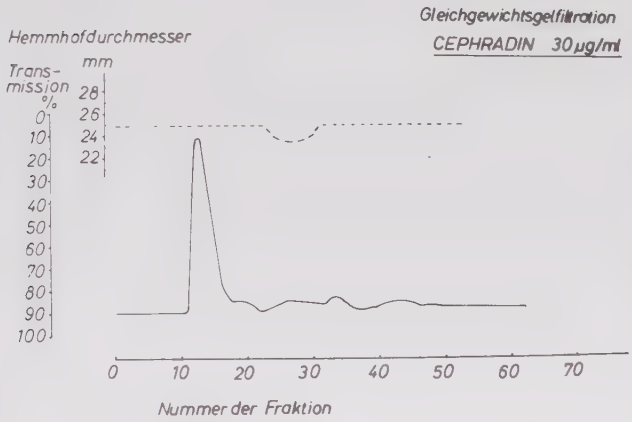
Die Proteinbindung von Cephalothin (Prozentangaben)

	5 µg/ml	10 µg/ml
Gleichgewichts-gelfiltration	34	37
Frontalanalyse	46	53
Centriflo	51	62
Diaflo	60	57
Centriflo mit Äquilibrierung	51	63
Diaflo mit Äquilibrierung	33	37

Cephradin

Bei der Gleichgewichtsgelfiltration von Cephradin 30 µg/ml sank der Hemmhofdurchmesser von 16,2 auf 15 mm, was einer Eiweißbindung von 23 % gleichzusetzen ist (siehe Abbildung 5).

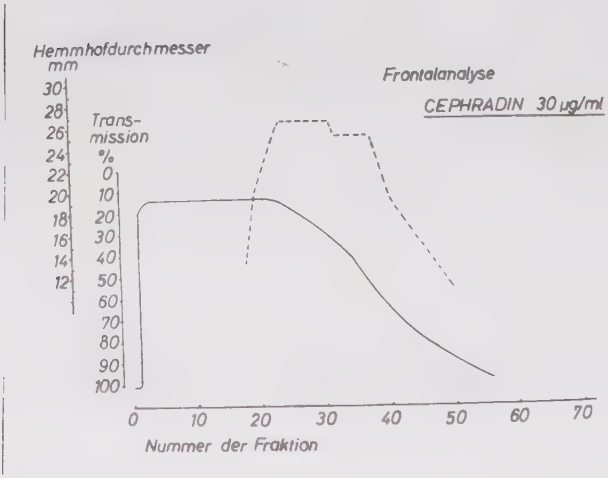
Abbildung 5:



Bei der Frontalanalyse wurde eine Verminderung des Hemmhofdurchmessers von 16,6 auf 13,5 mm beobachtet. Dies entspricht einer Eiweißbindung von 19 % (siehe Abbildung 6).
Die Gleichgewichtsgelfiltration von Cephradin 10 µg/ml führte zu einer Verminderung der Hemmhofdurchmesser von 16,2 auf 15 mm (siehe Abbildung 7), entsprechend 20 % Eiweißbindung. Die Frontalanalyse (siehe Abbildung 8) ergab mit Plateaus bei 18,8 und 17,8 mm 16 % Bindung.

Die Resultate aus den Ultrafiltrationsexperimenten sind in Tabelle 2 zusammengestellt. 30 µg/ml Cephradin wurden zwischen 11 und 23 % gebunden (Mittelwert: 16,2 %). Die Eiweißbindung von 10 µg/ml war im Mittel 13,25 % (Grenzwerte: 7 und 20 %).

Abbildung 6:



Anreicherungen von antibakteriell aktiver Substanz wurden bei der Untersuchung nach dem Centriflo-Verfahren ohne Äquilibrierung festgestellt, ebenso bei der Untersuchung von 10 µg/ml Cephradin nach dem Diaflo-Verfahren mit Äquilibrierung.

Abbildung 7:

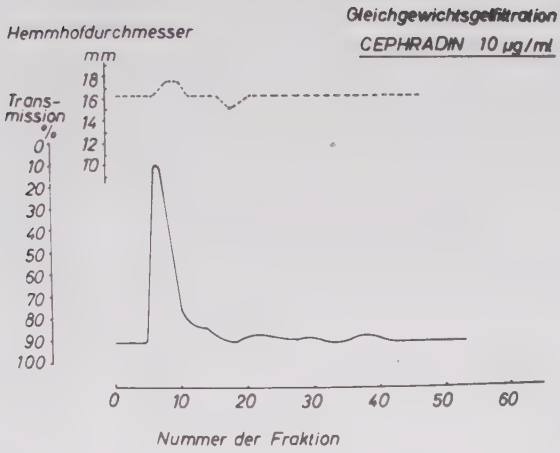


Abbildung 8:

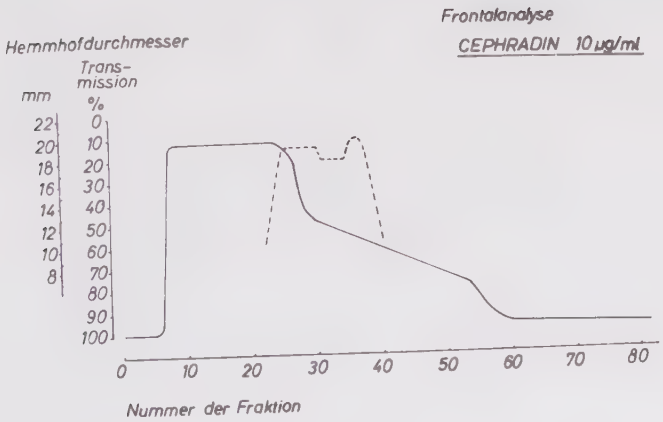


Tabelle 2:

Die Proteinbindung von Cephradin (Prozentangaben)

	30 µg/ml	10 µg/ml
Gleichgewichts-gelfiltration	23	20
Frontalanalyse	19	16
Centriflo	A	A
Diaflo	14	10
Centriflo mit Äquilibrierung	14	7
Diaflo mit Äquilibrierung	11	A

A = Anreicherung

Cefazolin

Die Eiweißbindung des Cefazolin bei 60 µg/ml wurde mit 37 bis 70 % bestimmt, wobei als Mittelwert 57,67 % gefunden wurden. Auffallend geringe Werte ergab die Gleichgewichtsgelfiltration mit 37 % (siehe Abbildung 9). Nach der Frontalanalyse zeigten sich im Agardiffusionstest-Diagramm zwei deutliche Plateaus bei 30,5 und 24,0 mm. Aus der Eichkurve ließen sich 67 % Aktivitätsabnahme ermitteln (siehe Abbildung 10).

Abbildung 9:

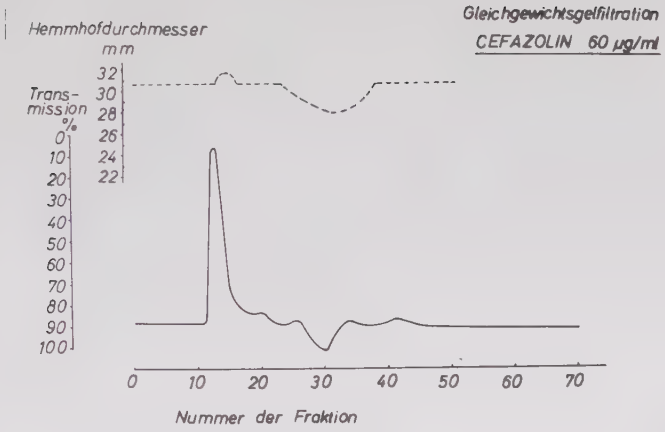
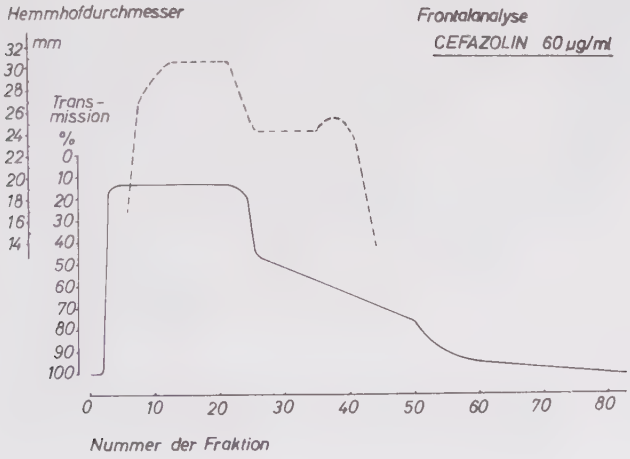
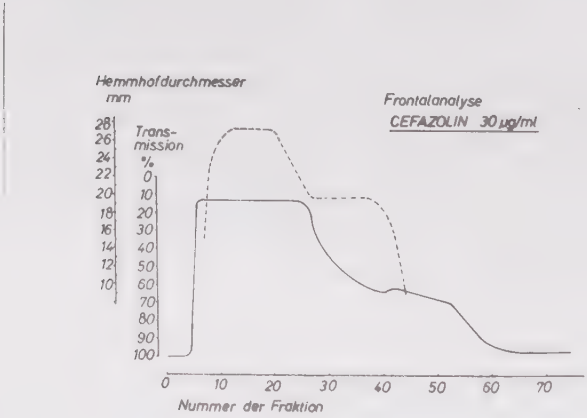


Abbildung 10:



Cefazolin 30 µg/ml war 32 bis 75 % an Proteine gebunden, im Mittel 56,83 %. Mit Äquilibrierung wird die Eiweißbindung in Diaflo und Centriflo mit 58 % bestimmt. Ohne Äquilibrierung ergeben sich bei Centriflo 65 %, bei Diaflo 53 %. Bemerkenswert ist dabei, daß die Proteinbindung nach der Äquilibrierung höher ist, eine Beobachtung, die auch bei der höheren Konzentration gemacht wurde.
Die Grenzwerte des oben genannten Bereiches wurden mit den, an sich miteinander verwandten Gelfiltrationsverfahren bestimmt. Die Frontalanalyse (Abbildung 11) führte zu einer Abnahme der Hemmhofdurchmesser von 27,11 auf 19,82 mm, was einer Eiweißbindung von 75 % entspricht.

Abbildung 11:



Die Gelfiltration im Gleichgewicht wies dagegen nur 32 % gebundenes Cefazolin aus (siehe Abbildung 12). In Tabelle 3 sind die Ergebnisse der Ultrafiltrationen zusammengefaßt. Dabei fiel auf, daß sich bei den Diaflo-Experimenten nach der Äquilibrierung höhere Zahlenwerte für die Eiweißbindung ergaben.

Abbildung 12:

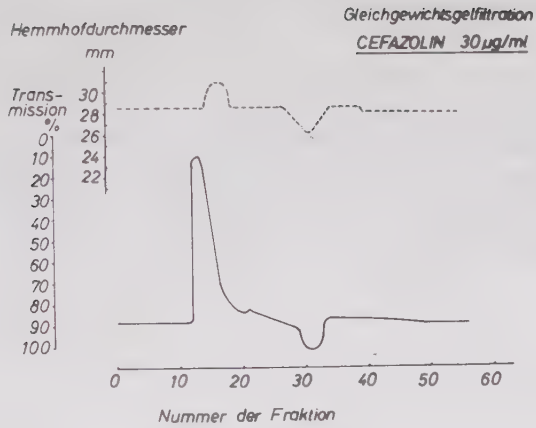


Tabelle 3:

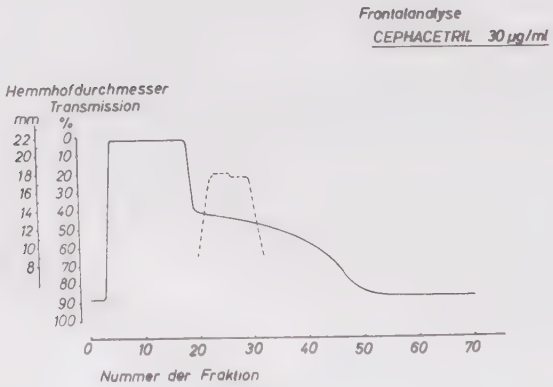
Die Proteinbindung von Cefazolin (Prozentangaben)

	60 µg/ml	30 µg/ml
Gleichgewichts-gelfiltration	37	32
Frontalanalyse	67	75
Centriflo	70	65
Diaflo	55	53
Centriflo mit Äquilibrierung	53	58
Diaflo mit Äquilibrierung	64	58

Cephacetril

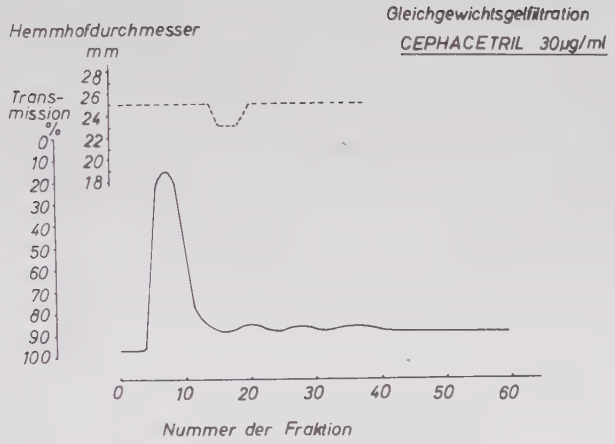
Die Eiweißbindung des Cephacetril 30 µg/ml wies eine Streubreite von 8 bis 31 % auf, der Mittelwert betrug 18 %.
Frontalanalyse (Abbildung 13) und Centriflo ergaben übereinstimmend 8 % Aktivitätsverlust. Aus den im Agardiffusionstest bestimmten Hemmhofdurchmessern und den in Eichkurven abgelesenen entsprechenden Konzentrationen erkennt man bei der Frontalanalyse einen Schwund der ursprünglich eingewogenen 30 µg/ml auf nur noch 2,8 µg/ml.

Abbildung 13:



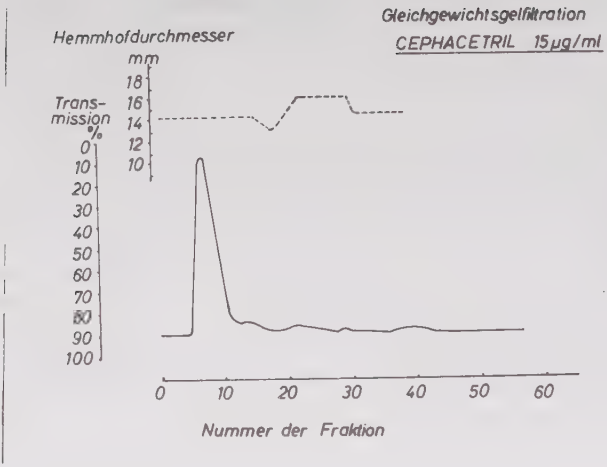
Der obere Grenzwert von 31 % wurde mit der Gleichgewichtsgelfiltration (siehe Abbildung 14) ermittelt, bei der die Aktivität im Eluat von 10,5 auf 7,3 µg/ml sank.

Abbildung 14:



Bei der Cephacetrilkonzentration von 15 µg/ml wurde mit der Gleichgewichtsgelfiltration (siehe Abbildung 15) eine Proteinbindung von 19 % bestimmt. Dagegen war mit der Frontalanalyse keine Eiweißbindung nachweisbar: Im Agardiffusionstest hatten sich keine Hemmhöfe ausgebildet; es konnte nur eine schmale Zone mit verminderter Koloniedichte um das Testblättchen bei Fraktion 33 bis 35 beobachtet werden. Ein Kontrollversuch führte zu keinem anderen Ergebnis, obschon hier eine Hemmhofbildung zwischen den Fraktionen 18 und 35 auftrat. Diese entsprach aber nur einer Cephacetrilkonzentration von circa 6 µg/ml.

Abbildung 15:



Die Ergebnisse aus den Ultrafiltrationsverfahren sind in Tabelle 4 zusammengestellt. Auffallend war das Resultat aus der Bestimmung im Centriflo-Verfahren mit Äquilibrierung; das Ergebnis 8 % Eiweißbindung erwies sich jedoch mehrfach als reproduzierbar.
Die Eiweißbindung von Cephacetril betrug bei der Konzentration von 15 µg/ml 15 bis 19 %, im Mittel 16,2 %.

Tabelle 4:

Die Proteinbindung von Cephacetril (Prozentangaben)

	30 µg/ml	15 µg/ml
Gleichgewichts-gelfiltration	31	19
Frontalanalyse	8	-
Centriflo	20	16
Diaflo	18	16
Centriflo mit Äquilibrierung	8	15
Diaflo mit Äquilibrierung	23	15

Cephalexin

Für die Bestimmung der Eiweißbindung von Cephalexin erwiesen sich die sonst eingesetzten Verfahren weniger geeignet.
Die Frontalanalyse von Cephalexin 15 µg/ml (siehe Abbildung 16) zeigte einen Abfall der Hemmhofdurchmesser von 18,7 auf 18,2 mm, entsprechend einer Bindung von 7 %. Bei Cephalexin 5 µg/ml (Frontalanalyse, siehe Abbildung 18) wies die Hemmhofverminderung von 11,3 auf 10,2 mm eine Eiweißbindung von 4 % aus. Mittels der Gleichgewichtsgelfiltration (siehe Abbildung 17) wurde die Eiweißbindung von Cephalexin 15 ug/ml mit 20 % bestimmt. Allerdings fanden sich im Eluat nur noch 61 % der Aktivität der Elutionsflüssigkeit.

Abbildung 16:

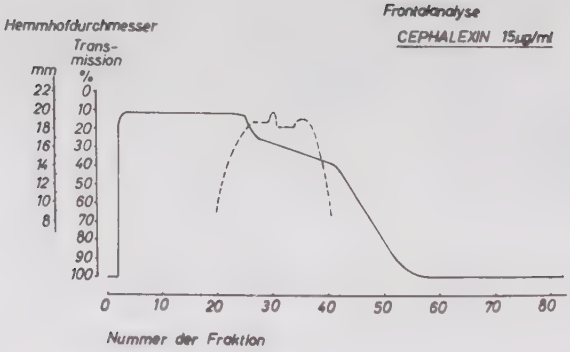
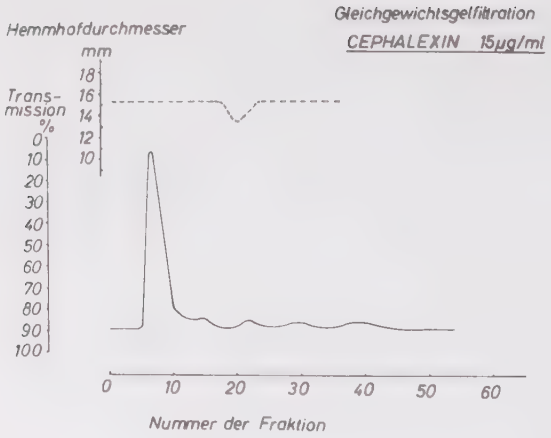


Abbildung 17:



Die Gleichgewichtsgelfiltration mit 5 µg/ml Cephalexin scheiterte wiederholt. Um die Testblättchen hatten sich lediglich 0,5 bis 1,0 mm breite Zonen mit verminderter Koloniedichte gebildet. Eine Aussage über die prozentuale Eiweißbindung von Cephalexin 5 µg/ml ist mit der Gleichgewichtsgelfiltration nicht möglich. Bei der Frontalanalyse dagegen (siehe Abbildung 18) wurden keine Verluste von antibakterieller Aktivität beobachtet.

Bei den Membranfiltrationsverfahren (siehe Tabelle 5) kam es fast immer zur Anreicherung von antibakteriell wirksamer Substanz im Ultrafiltrat. Die Konzentrationen von Cephalexin lagen dort um bis zu 120 % über der Ausgangskonzentration im Serum.

Die zur Ultrafiltration nach dem Diaflo-Verfahren verwendeten PM 30 Membranen ergaben nur bei Cephalexin 30 µg/ml eine Veränderung der Hemmhofdurchmesser, die als Folge einer Bindung von Cephalexin an Serumproteine gedeutet werden konnte, nämlich 13 und 14 % Aktivitätsverlust.

Keine Ergebnisse erbrachte die Verwendung von UM 2 Membranen, sowie der Versuch Cephalexin in destilliertem Wasser zu lösen und im gesamten Versuchsablauf die Phosphatpufferlösung durch aqua destillata zu ersetzen, der Versuch also, durch Änderung des Ionenmilieus zu einem Resultat zu kommen.

Die Eiweißbindung von Cephalexin liegt demnach zwischen 4 und 20 %.

Abbildung 18:

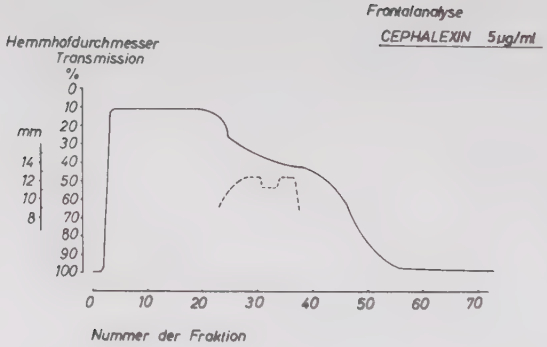


Tabelle 5:

Die Proteinbindung von Cephalexin (Prozentangaben)

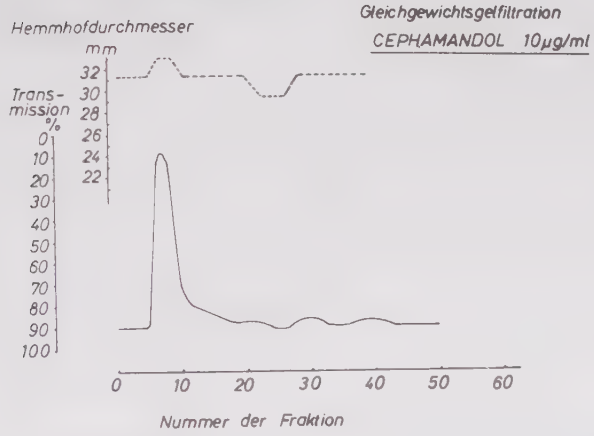
µg/ml →	Cephalexin 15	Cephalexin 5	Cephalexin mit UM 2 15	Cephalexin mit UM 2 5	in aqua destill. 15	in aqua destill. 5
Gleichgewichts-gelfiltration	20	Ø				
Frontalanalyse	7	4				
Centriflo	A	A			4	Ø
Diaflo	A	A	A	A	A	A
Diaflo mit Äquilibrierung	13	A	A	A	Ø	A
Centriflo mit Äquilibrierung	4	A			Ø	Ø

A = Anreicherung
Ø = Eiweißbindung konnte nicht in Zahlen bestimmt werden.

Cephamandol

Die Gleichgewichtsgelfiltration von Cephamandol bei der Konzentration 10 µg/ml (siehe Abbildung 19) zeigte parallel zu dem photometrisch erfaßten Serumgipfel einen Anstieg der Hemmhofdurchmesser von 31,2 auf 32,8 mm, danach ein Absinken auf 27, 25 mm. Dies entspricht einer Eiweißbindung von 48 %.

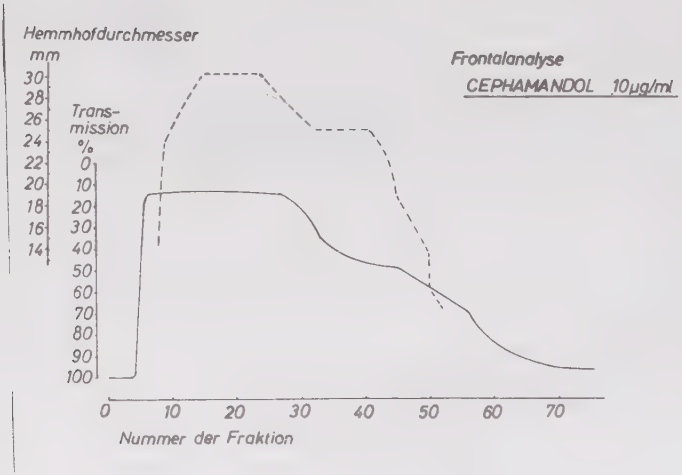
Abbildung 19:



Bei der Frontalanalyse (siehe Abbildung 20) ergaben sich zwei Plateaus, das eine bei 30,3 mm, das andere bei 25,2 mm. Daraus wurde eine Eiweißbindung von 58 % bestimmt. Bei beiden Gelfiltrationen wurden Aktivitätsverluste im Eluat gegenüber den eingewogenen antibakteriellen Aktivitäten festgestellt. Das Antibiotikum Cephamandol ist demnach zwischen 40 und 78 % an Serumeiweiße gebunden, im Mittel 56,7 %, wenn es in der Konzentration von 10 µg/ml im Serum vorliegt.

Stützt man sich bei der Festlegung von Grenzwerten für die Eiweißbindung von Cephamandol nur auf die Ergebnisse aus Gelfiltrationen und Ultrafiltrationen nach Äquilibrierung, ergeben sich 40 bis 58 % als Bereich und 47, 75 % als Mittelwert.

Abbildung 20:



Bei der Gleichgewichtsgelfiltration von Cephamandol 5 µg/ml (siehe Abbildung 21) zeigte sich eine Abnahme der Hemmhofdurchmesser von 27,0 auf 24,8 mm, entsprechend einer Eiweißbindung von 31 %. Wie schon bei der Konzentration von 10 µg/ml beobachtet, trat auch hier eine kurzfristige Erhöhung der Hemmhofdurchmesser parallel zum Serumgipfel in der Registrierung der Transmission auf.

Die Frontalanalyse (siehe Abbildung 22) ergab eine Inaktivierung von Cephamandol durch Serumproteinbindung von 55 %, was sich aus der Verminderung der Hemmhofdurchmesser von 25,0 auf 20,1 mm herleitet.

Abbildung 21:

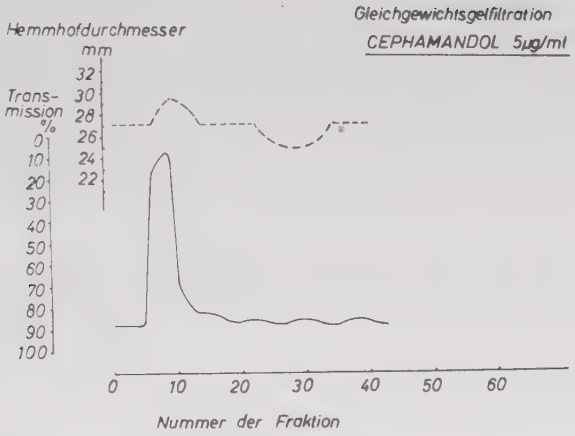
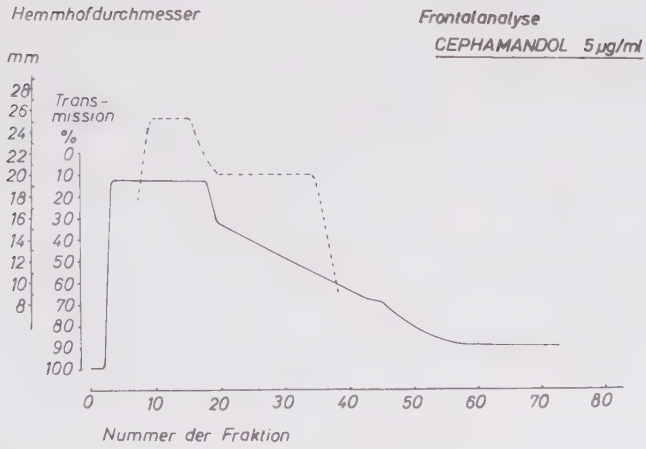


Abbildung 22:



Wie bereits bei der Konzentration 10 µg/ml, fielen auch hier Absorptionen bei der Gelfiltration auf; von den eingewogenen 5 µg/ml Cephamandol waren im Eluat nur 2 bis 3,4 µg/ml nachzuweisen.
Die Ergebnisse der Centriflo- und Diaflo-Ultrafiltrationen sind zusammengefaßt in Tabelle 6 dargestellt. Cephamandol 5 µg/ml war in geringerem Ausmaß an die Eiweiße des Serums gebunden, als dies bei der höheren Konzentration der Fall war. Der Bereich umfaßte hier 31 bis 73 %, der Mittelwert lautete 51, 17 %. Zieht man jedoch auch hier nur Gelfiltrationen und Ultrafiltrationen ohne Absorptionsverluste in Betracht, ergeben sich 31 und 58 % als Grenzwerte und 41, 75 % als Mittelwert.

Tabelle 6:

Die Proteinbindung von Cephamandol (Prozentangaben)

	10 µg/ml	5 µg/ml
Gleichgewichts-gelfiltration	48	31
Frontalanalyse	58	55
Centriflo	71	73
Diaflo	78	67
Centriflo mit Äquilibrierung	45	39
Diaflo mit Äquilibrierung	40	42

B. Einfluß der Nähragarkomponenten auf die Ergebnisse des Agardiffusionstests

Bei Verwendung von Mueller-Hinton-Agar ohne D.S.T.-Zusatz wurden größere Hemmhofdurchmesser festgestellt, als mit dem auf Seite 11 angegebenen Mueller-Hinton/D.S.T.-Gemisch. Daraus folgt, daß die Zusammensetzung des Nährmediums konstant sein muß, um vergleichbare Resultate zu erhalten.

C. Einfluß von Humanserum auf das Bakterienwachstum

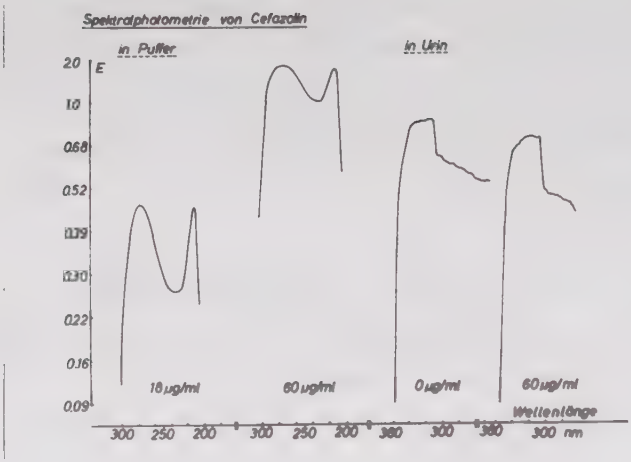
Es wurde eine Serumverdünnungsreihe so angelegt, daß jede Verdünnungsstufe 30 µg Cefazolin/ml enthielt.
Der Hemmhofdurchmesser betrug beim reinen Serum 29 mm, stieg bei 50 % Serumgehalt auf 29,3 mm und bei 20 % Serumgehalt auf 31 mm an. Dieser Wert wurde auch bei 30 µg Cefazolin/ml Phosphatpuffer gemessen.
Mit zunehmendem Serumgehalt ergab sich eine Abnahme der Hemmhofdurchmesser, das heißt Humanserum beeinträchtigt das Wachstum von Bacillus subtilis nicht.

D. Spektralphotometrie von Cefazolin und Cephacetril

Phosphatgepufferte Kochsalzlösung wies ein Absorptionsmaximum bei einer Wellenlänge von 200 nm auf. Licht mit einer Wellenlänge von 300 nm absorbierte sie praktisch nicht, bei 250 nm war sie noch zu 92 % durchlässig.

Cefazolin wurde in phosphatgepufferter Kochsalzlösung gelöst und bei verschiedenen Konzentrationen die Extinktion bei 270 nm gemessen. Mit steigender Antibiotikumkonzentration ergab sich eine Zunahme der Extinktion (siehe Abbildung 23 und Abbildung 24).

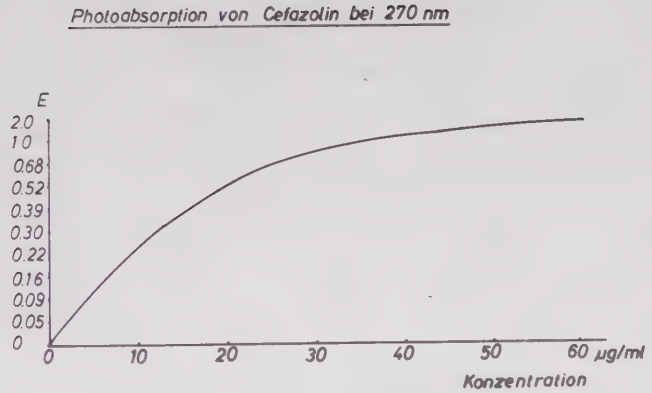
Abbildung 23:



Bei der Spektralphotometrie ergab sich ein Absorptionsmaximum bei ungefähr 270 nm. Der jeweils erste Gipfel in Abbildung 23 gibt, konzentrationsabhängig in seiner Höhe, die Photoabsorption des Cefazolin an, während der zweite Gipfel die Absorption der Pufferlösung reflektiert.
Der Cefazolin-Peak blieb sichtbar, wenn das Medikament in Serum gelöst wurde. Ein temporäres Fehlen von Cefazolin, wenn sich bei Gelfiltrationen das freie Antibiotikum im Innenvolumen der Sephadexkugeln befand, wurde erkannt an einer Zunahme der Transmission in den photometrischen Registrierungen. Dieses Phänomen ist in Abbildung 9 zu sehen.

Die Extinktionsmaxima des Cefazolin wurden in ein weiteres Diagramm eingetragen (Abbildung 24), um die Abhängigkeit der Photoabsorption von Cefazolin in Puffer von seiner Konzentration darzustellen.

Abbildung 24:

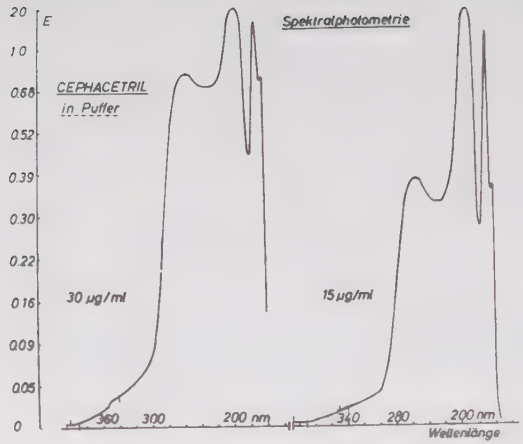


Die Photoabsorption von Cefazolin in Urin war wegen der starken Eigenabsorption der physiologischen Urinbestandteile nicht erkennbar.

Eine photometrische Konzentrationsmessung von Cefazolin war in Puffer und Serum, nicht aber in Urin durchführbar.

Cephacetril, in phosphatgepufferter Kochsalzlösung gelöst, zeigte ein Absorptionsmaximum bei 255 nm. Wie bereits bei der Untersuchung von Cefazolin ausgeführt, zeigte auch bei Cephacetril die Höhe des ersten Gipfels der spektralphotometrischen Registrierung eine Konzentrationsabhängigkeit. Der Ausschlag näherte sich mit zunehmender Konzentration einer maximalen Extinktion (siehe Abbildung 25).

Abbildung 25:



Ein photometrischer Nachweis von Cephacetril in Urin ließ sich allerdings nicht einmal bei den extrem hohen Konzentrationen von 1000 µg/ml führen, wie aus Abbildung 26 zu erkennen ist.

Eine für die Praxis wünschenswerte, einfache und sofort ablesbare Urinspiegelbestimmung auf der Grundlage photometrischer Verfahren war demnach auch für die in Puffer und Serum konzentrationsabhängig stark absorbierenden Antibiotika Cefazolin und Cephacetril nicht möglich.

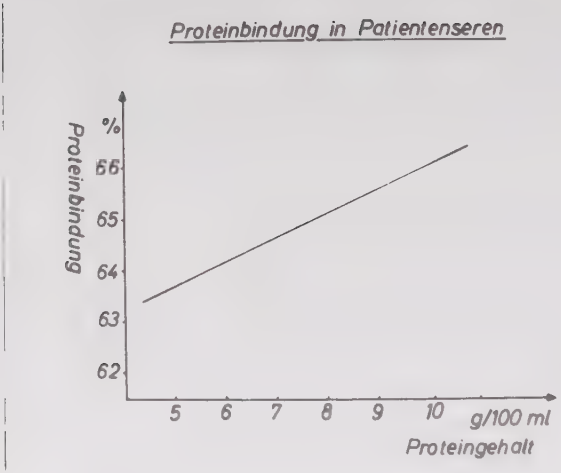
Abbildung 26:

E. Individuelle Schwankungen der Proteinbindung im Serum von Patienten

Um individuelle Faktoren bei der Eiweißbindung zu erkennen, wurde exemplarisch mit Cephalothin 10 µg/ml die Proteinbindung in zwanzig zufällig ausgewählten Patientenseren mit normalem und pathologischem Eiweißgehalt bestimmt. Methodisch wurde das Centriflo-Verfahren verwendet. Eine Äquilibrierung wurde nicht vorgenommen.

Die Patientenseren hatten einen Proteingehalt von 5,0 bis 10,1 g/100 ml, die Eiweißbindung schwankte zwischen 46,3 % und 76,6 %. Aus den Einzelbestimmungen wurde eine Regressionsgerade berechnet, welche durch die Gleichung Y = 61,77848703. - 0,4281641765 X festgelegt ist (siehe Abbildung 27).

Abbildung 27:



Nach dieser Beziehung ergab sich im Normalbereich des Serumeiweißgehaltes für Erwachsene und Kinder über drei Jahren (6,7 bis 8,7 g/100 ml) eine Schwankung der Eiweißbindung von Cephalothin 10 µg/ml von 64,25 % bis 65,10 %, mit einem Mittelwert von 64,7 %. Selbst pathologische Hypo- und Hyperproteinämien verursachten nur Abweichungen von höchstens 20 % Eiweißbindung vom Mittelwert, der 65 % betrug.

IV. Diskussion

Diskussion der eigenen Untersuchungen

Eine geringe Erhöhung oder Verminderung der Komplexbildung von Antibiotika mit Humanserum ist mit der Methode der Gelfiltration mit anschließendem Agardiffusionstest kaum zu erfassen. Die während der Serumpassage beobachtete Schwankung der Durchflußgeschwindigkeit oder eine ungleichmäßige Verteilung der Sporen im Agar können zu falschen Hemmhofdurchmessern führen. Negative Einflüsse dieser Art lassen sich auch bei großer Sorgfalt nicht völlig vermeiden (25). Eine von JUNGE (25) durchgeführte Vergleichsuntersuchung zeigte, bei Verwendung der selben Antibiotikumlösung, Schwankungen der Hemmhofdurchmesser im Agardiffusionstest von $\pm$ 0,4 mm. Dieser Zahlenwert konnte bestätigt werden. Allerdings führt diese Ungenauigkeit, abhängig vom jeweiligen Präparat und zunehmend mit dessen Konzentration, wegen der halblogarithmischen Auftragung der Eichkurven, zu Schwankungen der nach dem Agardiffusionstest abgelesenen Konzentrationen von 0,07 bis 4 µg/ml. Exemplarisch wurden Kontrolluntersuchungen von Centriflo-Ultrafiltrationen mit Cephalothin 10 µg/ml durchgeführt. Bei nacheinander am gleichen Tag, und bei an drei aufeinanderfolgenden Tagen durchgeführten Ultrafiltrationen, ergab sich eine Standardabweichung von unter 3 %. Allerdings zeigten, wie KUNIN (33) berichtet, Bindungsbestimmungen in Gleichgewichtsdialyseexperimenten gleich große Ergebnisse, gleichgültig ob mikrobiologische Tests oder Versuche mit radioaktiv markierten Trägern angewendet worden waren. Der Durchmesser des Hemmhofes ist direkt proportional zur Konzentration der antibakteriell wirksamen Substanz, wenn konstante Agarmengen verwendet werden, die Vordiffusionszeit genau eingehalten wird und eine definierte Bakterienzahl in allen Ansätzen vorliegt.

Die Komplexbildung von Antibiotika kann mit der Gelfiltration nur unvollständig bestimmt werden, da zwischen freiem und gebundenem Antibiotikum kein stationäres Gleichgewicht besteht (53). Dies wird bei den stärker gebundenen Substanzen Cephalothin, Cefazolin und Cephamandol bestätigt.

Verdünnt man menschliches Serum mit Phosphatpuffer stufenweise von 100 % auf 2,5 %, so erwartet man eine Verminderung der Eiweißbindung. Diese Verminderung, in der Literatur bereits früher angegeben (49), wurde auch in dieser Untersuchung festgestellt. In dem hier beschriebenen Versuch läßt sich aber nicht sicher unterscheiden, wieviel des Aktivitätsverlustes durch die Bindung an die Serumproteine, und wieviel durch eine inaktivierende Wirkung des Serums an sich verloren gegangen ist.

MHK-Werte, (MHK = Minimale Hemmkonzentration), die in serumfreien Nährmedien gefunden werden, müssen immer in Beziehung gesetzt werden mit in vivo gefundenen Spiegeln. Der Aktivitätsverlust in Untersuchungen von ULLMANN (63) und in dieser Untersuchung, sind wahrscheinlich Folge einer echten Inaktivierung und nicht durch Proteinbindung verursacht.
Allerdings läßt sich ein Meßfehler in geschlossenen Diffusionssystemen als Grund nicht ausschließen, was besonders im Hinblick auf die Ergebnisse bei anderen Antibiotika vernünftig erscheint, wo mit verschiedenen Methoden eine Proteinbindung beobachtet worden war, aber kein Verlust an Aktivität bei Serumzugabe (63).
Die Wirkung der meisten Cephalosporinderivate wurde in Gegenwart von Serum nicht signifikant gehemmt (36).
Auch eine von QUINN (47) beobachtete Hemmung durch gepooltes Serum erwies sich als nicht immer reproduzier-

bar. Das Wachstum von Streptokokken ließ sich durch Serum, das mit Nähragar auf 30 % Konzentration verdünnt war, allein nicht hemmen (61).
Eine Hemmung des Wachstums des Bacillus-subtilis durch Serum kann mit dieser Versuchsanordnung nicht bewiesen werden, da hier Komplexbildungen mit Eiweißkörpern von Bedeutung sind. Gebundenes Cefazolin ist antibakteriell unwirksam und auch an der Diffusion gehindert. Selbst wenn eine Trennung der Protein-Antibiotikum-Komplexe erfolgte, so ist nicht sicher, ob nicht eine zeitliche Verschiebung zu Ungunsten der Serum-Antibiotikum-Lösung eintritt, so daß dieselben maximalen Hemmhofdurchmesser nicht beobachtet werden können, da sie erst nach Ende des Beobachtungszeitraumes voll ausgebildet sind.
SCHOLTAN und SCHMID (54) führten, vermutlich ähnlichen Überlegungen folgend, dieses Verfahren unter dem Namen "Plattendiffusionstest" als Methode zur Bestimmung der Proteinbindung ein.
Würde man diesen Versuch als Plattendiffusionstest zur Bestimmung der Eiweißbindung von Cefazolin werten, so errechnete man den Wert von nur 28,20 % Eiweißbindung, der deutlich unter den hier und in der Literatur ermittelten Ergebnissen liegt.
Anzufügen ist die Feststellung von ADAM (1), "frisches aktives Humanserum" weise eine "Serumbakterizidie" auf. Dadurch würden proteinbindungsbedingte Wirkungsverluste teilweise ausgeglichen, bei geringgradig gebundenen Präparaten sogar völlig überdeckt. Die antimikrobielle Wirkung eines gering gebundenen Chemotherapeutikums sei nach Frischserumzusatz größer als in einer serumfreien Flüssigkeitskultur.

Cephalothin

Cephalothin liegt nach früheren Untersuchungen zu 38 % (38 a) bis 79 % (40) an Eiweiß gebunden vor. Die Proteinbindung war mit Gleichgewichtsdialyse (6) und Ultrafiltration bestimmt worden, wobei im zweiten Fall die Verwendung von 100 % Humanserum bestätigt wird, im ersten nur vermutet werden kann. In gepooltem Hundeserum waren bei einer Konzentration von 20 µg/ml nur 40 % an Proteine gebunden (66).
Fast durchweg ist die Proteinbindung von Cephalothin für die höhere Konzentration größer; beim Ergebnis aus der Ultrafiltration nach dem Diaflo-Verfahren handelt es sich wahrscheinlich um eine durch diese Methode verursachte Änderung der Ergebnisse. Die Unterschiede betragen mitunter nur 3 oder 4 %, was an der Grenze der Genauigkeit der Methoden liegt. Bei den Bestimmungen nach dem Centriflo-Verfahren traten Differenzen von 11-15 % auf. Die Konstanz dieser Befunde und das Verhalten der Mittelwerte wiesen auf eine Konzentrationsabhängigkeit der Eiweißbindung bei Cephalothin hin; mit wachsender Konzentration nimmt die Bindung an Proteine zu. Die in der Literatur (6) genannten Werte, ermittelt bei 50 µg/ml, liegen über den hier bei 5 und 10 µg/ml festgestellten. Für die Richtigkeit dieser Ergebnisse, sowie für die Brauchbarkeit der angewendeten Methoden spricht der geringe Unterschied zwischen den Zahlenwerten. Die Mittelwerte und die oberen Grenzwerte liegen innerhalb des Bereiches von 38 bis 79 % (38 a), die unteren Grenzwerte unterschreiten mit 34, beziehungsweise 37 % die genannten Grenzen kaum. Der bei beiden Konzentrationsstufen mit der Äquilibrierung korrelierte Unterschied der Eiweißbindung bei der Ultrafiltration nach dem Diaflo-Verfahren weist auf unzulässige Vorgänge an der Membran hin, wie sie nach Angabe des Herstellers (2 a) bei dieser Art von Ultrafiltern ausgeschlossen sein sollten. Es kommen Ab- oder Adsorptionsvorgänge in Betracht, aber auch Folgen einer Konzentrationsüberhöhung.

Die beträchtlichen methodischen Unterschiede lassen es sinnvoll erscheinen, die Eiweißbindung für die jeweilige Konzentration mit mehreren Methoden zu bestimmen, wobei allerdings nicht gesagt werden kann, daß die, mit 53 % (10 µg/ml) und 46 % (5 µg/ml) den Mittelwerten am nächsten liegenden Ergebnisse der Frontalanalyse, diese als das richtigste und genaueste Verfahren für Cephalothin qualifizieren.

Cephradin

In der Fachliteratur wird die Eiweißbindung von Cephradin mit 0 (19) bis 47,5 % (27) angegeben. 6 % Eiweißbindung werden vom Hersteller in der Werbung zitiert (20). Dieser Wert soll nach Gabe von "therapeutischen Dosen" durch Ultrafiltration ermittelt worden sein. Der obere Grenzwert wurde ebenfalls mittels Ultrafiltration bei einer Konzentration von 25 µg/ml Cephradin festgestellt (27). Bei dieser Untersuchung wurde die Konzentration auf bis 1000 µg/ml gesteigert und dabei eine Abnahme der Eiweißbindung festgestellt.
Die Ergebnisse dieser Untersuchung mit 11 bis 23 % (16,2 %) für 30 µg/ml und 7 bis 20 % (13,25 %) für 10 µg/mg lagen näher bei den unteren Grenzwerten (20, 56). Grenz- und Mittelwerte bestätigen eine Zunahme der Eiweißbindung mit steigender Konzentration, allerdings nur im Bereich der physiologischerweise vorkommenden Blutspiegel und nicht bei Konzentrationen von bis zu 1000 µg/ml. Die Anreicherung der antibakteriellen Aktivität im Ultrafiltrat, die bei drei Versuchsanordnungen jeweils wiederholt auftrat, dürfte verschiedene Gründe haben. Bei der Äquilibrierung der Diaflo-Ultrafilter könnte es durch Adsorptions- oder Absorptionsvorgänge zur Anreicherung von Cephradin an den Membranen gekommen sein; bei der anschließenden Ultrafiltration wurde dann das Cephradin wieder abgegeben, und zwar in das Ultrafiltrat. So könnte

es zu der auffallend hohen Aktivität in den Ultrafiltraten, verglichen zu den Ausgangsaktivitäten in den Seren gekommen sein. Andere Ursachen muß die höhere Aktivität im Centriflo-Ultrafiltrat haben. Durch Deckschichteffekte mag es zu unterschiedlicher Permeabilität der Membran für Antibiotikum und Lösungsmittel gekommen sein, so daß bei verstärktem Antibiotikum-Durchtritt Puffer zurückgehalten wurde und eine Konzentrierung des Antibiotikums im Filtrat erfolgte. Eine befriedigende Erklärung über die genaue Ursache dieser Fehler läßt sich aus der Erkenntnis, daß sie sich durch Äquilibrierung vermeiden lassen, nicht herleiten. Auffallend ist der in der Gleichgewichtsgelfiltration auftretende Anstieg der Hemmhofdurchmesser parallel zu dem photometrisch ermittelten Serumpeak, ein Phänomen, das außer bei Cephradin 10 µg/ml auch bei Cephamandol in den untersuchten Konzentrationen auftritt. Dieses Phänomen muß mit den genannten Präparaten korreliert sein, da Serumbakterizidie (1) unter diesen Versuchsbedingungen auszuschließen ist.

Cefazolin

Cefazolin war bei einer Konzentration von 30 µg/ml zu 32 bis 75 % (56, 83 %) an Proteine gebunden, bei 60 µg/ml zu 37 bis 70 % (57, 67 %). Die Literatur gibt bisher als Grenzwerte 58 (37) und 100 % (27) an. Die Mehrzahl der Autoren schreibt von Werten zwischen 60 und 90 % (siehe Tabelle Seite 73). Schlecht vergleichbar sind Werte, die mit tierischen Seren gewonnen wurden (66). BERGERON und Mitarbeiter (6) ermittelten bei einer Konzentration von 50 µg/ml in einer Gleichgewichtsanalyse 81 % Eiweißbindung, 86,7 % fanden KIOSZ et al. (27). Die niedrigeren Zahlenwerte in dieser Untersuchung rühren daher, daß die Cefazolinkonzentrationen in den verschiedenen Eluatportionen einen erheblichen Verlust an antibakterieller Aktivi-

tät gegenüber der Elutionsflüssigkeit aufwiesen. So waren von der Einwaage 60 µg/ml maximal 36 µg/ml, von der zu 30 µg/ml nur 20 bis 25 µg/ml im Eluat nachzuweisen. Diese Ausbeute ließ sich nicht steigern durch Verlängerung der Äquilibrierungszeit der Sephadex-Säule von normalerweise ausreichenden 2,5 Stunden auf 8 Stunden bei der Gleichgewichtsgelfiltration. Auch die Aufbewahrung der Elutionsflüssigkeit bei 4 °C und das Nachfüllen des Vorratsgefäßes mit kleinen Portionen brachte keine Vergrößerung der Hemmhofdurchmesser.

Nach WATERMAN et al. (66) ist eine Inkubationszeit von mindestens 50 Minuten einzuhalten, bis in Hundeserum die maximale Eiweißbindung von Cefazolin, die sie mit 80 % angeben, erreicht ist. Diese Erkenntnis, die nicht kritiklos auf die Verhältnisse im Menschen übertragen werden darf, könnte die bei allen Methoden eher niedrig ausgefallenen Werte der Eiweißbindung des Cefazolins mit ungenügend langer Inkubation erklären helfen.

Schließt man sich der Meinung von SCHOLTAN (53) an, nach der das Proteinbindungsvermögen im menschlichen Serum stets größer als im tierischen ist, ließe sich die hier im Vergleich zur Literatur relativ niedrig bestimmte Proteinbindung des Cefazolin mit der Tatsache erklären, daß hier eine Inkubationszeit von 30 Minuten eingehalten wurde. Dafür sprechen auch die höheren Zahlenwerte, die die Frontalanalyse ergab, da während der Sterilfiltration des Serums eine längere Inkubationszeit zur Verfügung stand. Der von WATERMAN et al. (66) angegebene Zahlenwert der Cefazolinbindung nach 30 Minuten liegt sehr nahe bei den hier ermittelten Ergebnissen. Allerdings muß einschränkend berücksichtigt werden, daß Serum zweier verschiedener Spezies verwendet wurde.

Adsorptionsvorgänge und damit verbundene oder davon unabhängige Inaktivierungen von Cefazolin in Gegenwart von Sephadex könnten bei beiden Gelfiltrationsmethoden von Bedeutung sein.

Die mit 67 und 75 % in der Frontalanalyse hoch ausgefallenen Eiweißbindungsraten könnten auf die, während der Sterilfiltration zusätzlich zur Verfügung gestandene Inkubationszeit zurückzuführen sein. Dieser Effekt würde, wie WATERMAN und Mitarbeiter(90) für Cephalothin und Cephaloridin mitteilen und wie die Erfahrung mit anderen Antibiotika lehrt, bei kaum einer anderen Substanz zur Verfälschung des Ergebnisses der Proteinbindungsbestimmung führen.
Ungeklärt bleiben mußte die Beobachtung, daß bei der Diaflo-Technik mit Äquilibrierung ein höherer Aktivitätsverlust festzustellen war als ohne. Neben der von der Bestimmungsmethode unabhängigen Eiweißbindung müssen hier andere Vorgänge zur Inaktivierung des Medikamentes geführt haben.

Cephacetril

Über die Eiweißbindung von Cephacetril wird in nur wenigen Veröffentlichungen berichtet. Die Ergebnisse liegen zwischen 23 (41) und 35 % (39). Allerdings wird nicht mitgeteilt, bei welcher Antibiotikumkonzentration diese Zahlenwerte ermittelt worden waren. Diese Untersuchung ergab für Cephacetril 15 µg/ml 15 bis 19 % (16,2 %), also eine etwas geringere Bindung. Bei 30 µg/ml Cephacetril resultierten 8 bis 31 % (18 %) Eiweißbindung. Übereinstimmung ist dann gegeben, wenn die Literaturwerte bei höheren Cephacetrilkonzentrationen ermittelt worden sind, da sich auch hier eine Zunahme der Eiweißbindung mit steigender Antibiotikumkonzentration abzeichnet. Auffallend ist das mit 8 % Eiweißbindung sehr niedrige Ergebnis bei der Frontalanalyse und bei Centriflo mit Äquilibrierung bei 30 µg/ml. Es ist anzunehmen, daß Cephacetril durch den Kontakt mit Sephadex inaktiviert wird. Das Elutionsmittel bei der Gleichgewichtsgelfiltration wies die der eingewogenen Antibiotikummenge adäquate Hemm-

hofbildung auf, wohingegen die Aktivität des Eluats stark reduziert gefunden wurde.
Identische Ergebnisse bei Ultrafiltrationen mit und ohne Äquilibrierung sprechen für einwandfreie Filtrationsverhältnisse. Bei der Untersuchung von Cephacetril 30 µg/ml scheint dies nicht gewährleistet zu sein; bei mehreren Kontrolluntersuchungen waren mit Äquilibrierung 8 % und ohne Äquilibrierung 20 % Eiweißbindung ermittelt worden.
Die Ergebnisse der Ultrafiltrationen liegen mit 15 und 16 % Eiweißbindung sehr nahe beim Mittelwert von 16 % für 15 µg/ml.

Cephalexin

Die Eiweißbindung von Cephalexin wurde bereits mehrfach bestimmt. Dabei wurden 13 % (26) bis 50 % (43) Cephalexin als durch Proteinbindung inaktiviert angegeben. NAUMANN und FEDDER (43) berichten über 38 bis 50 % Eiweißbindung.
Die Bestimmung war mit dem Agardiffusionstest erfolgt; zunächst war die Aktivitätsdifferenz einer analytischen Einwaage von 5 µg/ml Cephalexin in 100 % Humanserum und in Phosphatpuffer bestimmt worden. Ein Aktivitätsverlust des Antibiotikums, wie er bei einer 12stündigen Diffusion eintritt, könnte die prozentuale Eiweißbindung zu groß erscheinen lassen (27). Auch gehen in dieses Ergebnis mögliche andere aktivitätsmindernde Faktoren ein, da in diesem Verfahren freie und gebundene Substanz nicht getrennt werden, sondern die Differenzierung allein aus der verminderten Wirkung im Serum erfolgt.
KIND et al. (26) fanden 13 bis 19 % (15 %) mittels einer Ultrafiltrationsmethode bei einer Konzentration von 10 µg/ml. Die Ergebnisse kommen sich näher, wenn, wie NAUMANN und FEDDER (43) angeben, die Eiweißbindung mit steigender Konzentration abnimmt: Sie war bei 1,56 µg/ml 57 % und sank bei 10 µg/ml auf 53 % ab. Diese Tendenz

steht allerdings im Widerspruch zu den bei den anderen Antibiotika aus der Cephalosporinreihe gefundenen Ergebnissen.
Keine Zahlenwerte konnten im Diaflo-Verfahren unter Verwendung von UM 2 Membranen ermittelt werden. Mit diesen konnte keine quantitative Bestimmung der Eiweißbindung von Cephalexin durchgeführt werden, obwohl ihre Anwendung in stark verdünnter Phosphatpufferlösung zulässig ist (2 b). Es konnten nur Anreicherungen von Cephalexin im Ultrafiltrat festgestellt werden. Derartige Konzentrationsüberhöhungen traten mit und ohne Äquilibrierung gleichermaßen auf.
Auch bei der Verwendung von PM 30 Membranen, die in aqua destillata vorbehandelt worden waren, zeigten sich diese Anreicherungen. Eine Ursache für diese Phänomene, die auch bei Cephradin aufgetreten sind, kann die Konzentrationsüberhöhung sein. Die Konzentrationsüberhöhung oder Konzentrationspolarisation wird dadurch verursacht, daß sich die von der Membran zurückgehaltenen Stoffe an der Membranoberfläche anreichern. Im Gefolge kommt es bei makromolekularen Lösungen oft zum Ausfallen der gelösten Komponenten, die sich dann auf der Membranoberfläche niederschlagen und dort wie eine Sekundärmembran wirken. Nicht nur die Filtrationsstromdichten werden beeinträchtigt, sondern sogar die Trenneigenschaften der Membran verändern sich dadurch. Dies ist besonders bedeutungsvoll, wenn ein Gemisch von Stoffen unterschiedlicher Molekülmasse durch Membranultrafiltration fraktioniert werden soll (51, 59). STRATHMANN (51) folgerte aus seinen Experimenten zur Konzentrationsüberhöhung für die Durchführung von Ultrafiltrationen: Es soll ein optimaler Arbeitsdruck eingehalten werden. Er ist gegeben, wenn es infolge der Konzentrationsüberhöhung gerade noch nicht zu einer Niederschlagsbildung kommt. Die Rührgeschwindigkeit beziehungsweise Strömungsgeschwindigkeit parallel zur Membranoberfläche soll so hoch wie möglich sein, wenn maxi-

male Filtrationsstromdichten und optimale Trenneffekte erreicht werden sollen. Ultrafiltrationen sollen mit möglichst verdünnten Lösungen durchgeführt werden, um Deckschichtbildungen zu vermeiden. Diese Idealbedingungen lassen sich nicht mehr einhalten. Da jedoch die Versuchsdurchführung für alle Cephalosporin-Antibiotika gleich erfolgte, läßt sich eine größere Neigung zur Konzentrationsüberhöhung entweder mit spezifischen Eigenschaften des Cephalexins erklären, oder aber damit, daß Cephalexin und die hier gebrauchten Membranen aus noch unbekannten Gründen nicht miteinander zu Komplexbildungsstudien verwendet werden können.

Cephamandol

Die Eiweißbindung des Cephamandol hängt in gleicher Weise, wie für die anderen Cephalosporinantibiotika beschrieben, von seiner Konzentration im Serum ab. Darauf weisen, neben fast allen Einzelwerten, auch die Mittelwerte hin.
Der Hersteller gibt 50 bis 70 % Eiweißbindung an (38 c). WARREN und WICK (67) haben die Proteinbindung von Cephamandol mit 27 bis 33 % ermittelt. Dieser Wert wurde ermittelt aus dem Vergleich zwischen Eichkurven in Serum und in Puffer. Keine Konzentrationsabhängigkeit der Proteinbindung wurde von ihnen nicht festgestellt. Kritisch ist an dieser Bestimmung anzumerken, daß anders

bedingte Inaktivierungen des Cephamandol unerkannt bleiben, wie auch ein Zerfall des Antibiotikum-Eiweiß-Komplexes. Ein solcher Zerfall ist aber hier sehr wahrscheinlich, denn zuverlässige Verfahren ließen eine Eiweißbindung von durchschnittlich 51 % bei 5 µg/ml und 57 % bei 10 µg/ml Cephamandol erkennen.
Die bei den Membranultrafiltrationen ohne Äquilibrierung höhere Eiweißbindungsangabe, gegenüber der Ultrafiltration mit Äquilibrierung, resultiert wahrscheinlich aus Absorptionsphänomenen, die Centriflo- und Diaflo-Membranen gleichermaßen betreffen. Läßt man nun diese Werte außer acht, so liegt die Eiweißbindung von Cephamandol 10 µg/ml zwischen 40 und 58 % (48 %), die von Cephamandol 5 µg/ml zwischen 31 und 52 % (44 %).

Individuelle Schwankungen der Eiweißbindung

Übereinstimmend wird in der Literatur von geringen individuellen Schwankungen der Eiweißbindung berichtet (33, 49, 65). Dies kann hier bestätigt werden. Die grundsätzliche Frage, ob es individuelle Unterschiede bei der Eiweißbindung gibt, ist demnach zu bejahen. Diese Unterschiede sind aber viel zu gering, als daß sie von praktischer Bedeutung sein könnten.
In dieser Untersuchung findet man neben gut übereinstimmenden Wertepaaren, wie Proteingehalt im Serum 10,1 g/100 ml - Eiweißbindung 76 %, auch Resultate wie Proteingehalt 5 g/100 ml - Eiweißbindung 68,9 % oder Proteingehalt 8,4 g/100 ml - Eiweißbindung 46,3 %. Diese Werte weisen darauf hin, daß trotz des grundsätzlichen Zusammenhangs zwischen Eiweißbindung und Proteinkonzentration auch andere Faktoren die Komplexbildung der Antibiotika mit Eiweißkörpern beeinflüssen, die sich nicht durch die Bestimmung des Gesamteiweißes im Serum erfassen lassen.

Dabei ist an gleichzeitig verabreichte Medikamente, die die Eiweißbindung fördern oder hemmen können, ebenso zu denken, wie an physiologische oder pathologische Blutbestandteile, wie Bilirubin, Cortisol, Calcium oder Paraproteine, die durch Überschuß oder Mangel beim kranken Menschen die Bindungsverhältnisse in komplizierter Weise verändern. Solche Einflüsse waren in dieser Untersuchung nicht erfaßbar.

Diskussion von Erkenntnissen zur Komplexbildung von Antibiotika mit Eiweißkörpern

Nach den Aussagen von O'CALLAGHAN und MUGGLETON (45) kommt es bei allen Penicillinen und Cephalosporinen in bestimmtem Umfang zu Komplexbildungen mit Serumeiweißkörpern. Diese Wechselwirkung zwischen Makromolekülen, niedermolekularen Stoffen und Ionen ist eine Bindungsreaktion, die dem Massenwirkungsgesetz gehorcht (53). Zu den Mechanismen für diese unspezifische Bindung von Pharmaka an Proteine zählen die Ionenbindung, die hydrophobe Bindung und die Bindung über Wasserstoffbrücken.

Die Ionenbindung entsteht durch die elektrostatische Anziehung unterschiedlich geladener Gruppen, wie sie zum Beispiel an einem Rezeptorprotein und an einem Gegenion vorliegen (16).

Wichtiger ist die vielseitigere hydrophobe Bindung, bei der eine Anlagerung hydrophober Stellen der Pharmaka an hydrophobe Stellen der Proteine erfolgt. Diese vielseitige Bindungsmöglichkeit erklärt die Tatsache, daß so viele verschiedenartige Substanzen an Proteine gebunden werden (16).

Wasserstoffbrückenbindungen entstehen durch die Wechselwirkung des H-Atomes eines Protonendonators mit einem Protonenakzeptor (16).

Serumeiweißkörper binden positiv und negativ geladene Ionen, sowie ungeladene Moleküle. Daraus geht hervor, daß die Ladung keine notwendige Voraussetzung für die Serumeiweißbindung ist (52, 53).

SCHOLTAN (53) betont die entscheidende Bedeutung der hydrophoben Gruppen bei der Eiweißbindung der Penicilline; daneben seien Ionenbindungen von untergeordneter Bedeutung. Bei etlichen Penicillinderivaten zeigten sich aromatische Seitenketten für die Bindung verantwortlich (31). Auch KUNIN (32) wies auf die vorherrschende Be-

deutung der Seitenketten des Penicillins bei der Eiweißbindung hin. Ihm waren Veränderungen der Eiweißbindung aufgefallen, die durch Variation der Seitenketten hervorgerufen wurden. Derivate der 7-Amino-Cephalosporansäure werden oft, aber nicht immer weniger gebunden, als 6-Amino-Penicillansäurederivate. FISCHER und JARDETZKY (14) zeigten aus der Bandenbreite im kernmagnetischen Resonanzspektrum und aus Hemmungsexperimenten, daß Penicilline mit Hilfe des p-Aminosulfonsäurerings an Albumin gebunden werden. Vernachlässigbar gering ist der Beitrag der 6-Amino-Penicillansäure zur Bindung von Albumin.
Die Komplexbildung von Penicillin mit Albumin ist eine exotherme Reaktion. Es kommt dabei zu einer Schwellung des Albuminmoleküls, zu einer Konfigurationsänderung und einer Änderung von zwischen- und intermolekularen Bindungen. Es ist anzunehmen, daß einige Antibiotika bereits in niedrigen Konzentrationen diese Veränderungen auslösen können, andere erst in hohen Konzentrationen. Die Zahl der bindenden Gruppen des Albuminmoleküls ist demnach variabel und nimmt mit wachsender Antibiotikumkonzentration zu (52).
Das unterschiedliche Ausmaß der Eiweißbindung von Arzneimitteln wird von KRIEGLSTEIN (31) eher auf die unterschiedliche Affinität der Bindungsreaktionen als auf die Anzahl der Bindungsstellen zurückgeführt. Es ist allerdings noch ungeklärt, inwieweit diese Erkenntnisse von einer Gruppe von Chemotherapeutika auf andere übertragbar sind, oder ob ihnen gar allgemeine Gültigkeit für die Interaktionen von Arzneimitteln und Proteinen zukommt.

"Die Bindung von Antibiotika an Eiweiß ist im wesentlichen reversibel und die Dissoziation des gebundenen Antibiotikums erfolgt rasch, ein Gleichgewicht mit dem ungebundenen Antibiotikum aufrecht erhaltend" (65). Über die grundsätzliche Reversibilität der Proteinbindung berichten

verschiedene Autoren (34, 49, 53, 54, 58). Allerdings ist strittig, ob die Proteinbindung vollständig reversibel ist (58), oder ob zumindest ein kleiner Teil des Medikamentes irreversibel gebunden bleibt (53, 65). ROLINSON und SUTHERLAND (49) berichten über ein Experiment, bei dem zwei Lösungen vergleichen wurden. Sie enthielten beide 10 µg/ml Cloxacillin in Phosphatpuffer mit 2,5 % Humanserum, jedoch war die eine durch Einwaage, die andere durch entsprechende Verdünnung von 400 µg/ml Cloxacillin in 100 % Serum hergestellt worden. In der durch Verdünnung entstandenen Lösung lag weniger Antibiotikum in seiner freien, aktiven Form vor. Ein geringer Prozentsatz der Antibiotikum-Proteinbindung scheint demnach irreversibel zu sein.

Aus der Bindungsstärke läßt sich zunächst nur erkennen, wie das Verhältnis der Konzentrationen von freier und gebundener Substanze im Gleichgewichtszustand ist. Es kann jedoch nichts über eventuelle Faktoren und Umstände ausgesagt werden, die zur Freisetzung des Antibiotikums aus der Serumbindung führen können. Außer durch die Änderung der Konzentration der freien Substanz kann eine Ablösung der gebundenen auch erfolgen, wenn im Serum (analog im Gewebe für Gewebeproteine) Stoffe auftreten, die eine größere Affinität zu den bindenden Eiweißkörpern aufweisen und so die ursprünglich gebundenen Substanzen von den bindenden Gruppen der Eiweißmoleküle verdrängen. Ferner kann eine Ablösung auch an solchen Phasengrenzflächen stattfinden, die das Pharmakon stärker binden als das Protein (54), ein Vorgang der für Ultrafiltrationsexperimente von Bedeutung sein kann.

Die Dissoziation erfolgt praktisch unmittelbar nach dem Verdünnen eines Serum-Antibiotikum-Gemisches; dies haben ROLINSON und SUTHERLAND (49) gezeigt. Der nicht gebundene Anteil stieg bereits im ersten Ultrafiltrat von 13 % auf 51 % und blieb über eine Stunde konstant. Auch bei der Zugabe von Penicillin zu Serum stellt sich das Gleichge-

wicht zwischen freiem und gebundenem Penicillin unmittelbar ein. Gegenteilige Ergebnisse veröffentlichten WATERMAN, SCHARFENBERGER und RAFF (66) für die Bindung von drei Cephalosporinantibiotika in Hundeserum, wie auf Seite 65 ausführlich dargelegt ist.

Variable, die die Komplexbildung mit Eiweißen beeinflussen:

Konzentration des Antibiotikums

Der freie Antibiotikumanteil hängt in unterschiedlichem Ausmaß von der Gesamtkonzentration ab (55).
SCHOLTAN und SCHMID (54) geben folgenden Zusammenhang zwischen Antibiotikumkonzentration und Proteinbindung an: $c_g = k \cdot c_f^m$, das heißt, zwischen dem Logarithmus c_g an gebundenem Penicillin und dem Logarithmus c_f an freiem Penicillin besteht ein linearer Zusammenhang, wobei sich das Bindungsvermögen durch die Angabe der apparenten Bindungskonstante k und der Steigungskonstante m ausdrücken läßt.
Während sich bei VERWAY und WILLIAMS (64) keine Veränderung der Eiweißbindung von Penicillin zwischen Konzentrationen von 5 und 100 µg/ml zeigte, traten bei den hier, mit möglicherweise feineren Methoden untersuchten Cephalosporinen geringfügige Veränderungen der Proteinbindung auf, die schon bei Unterschieden von 5 µg/ml meßbar waren. In der Regel wies die konzentrierte Lösung einer Substanz die höhere Eiweißbindung auf.
Diese Beobachtung gilt für alle Präparate und alle Verfahren, von geringen, vermutlich methodisch bedingten Ausnahmen abgesehen. Dies widerspricht nicht den Ergebnissen von ROLINSON und SUTHERLAND (49), die einen starken Anstieg der freien Substanz im Serum fanden, wenn die Konzentration über 200 µg/ml stieg. Unter 200 µg/ml beeinflußten Konzentrationsänderungen das Ausmaß der Eiweißbindung nur geringfügig. Bei den therapeutisch üblichen

Serumspiegeln ist nicht mit bedeutsamen Unterschieden in der Proteinbindung zu rechnen (49). KUNIN (33) weist besonders darauf hin, daß der Effekt der Proteinbindung bei steigenden Antibiotikumkonzentrationen nicht linear verläuft: erst ab einer Eiweißbindung von 70 % muß die Gesamtkonzentration des Antibiotikums im Serum steil ansteigen, um die gleiche Konzentration an freier Substanz zu gewährleisten.

Struktur des Antibiotikums

Geringe Änderungen an Ladung oder chemischer Konfiguration der Antibiotika können zu erheblichen Veränderungen ihrer Eigenschaften führen (36). Die Eiweißbindung hängt von der Struktur der Substanzen ab (49, 53, 54). Allerdings können aus der Struktur einer Substanz keine sicheren Voraussagen auf ihre Fähigkeit zur Komplexbildung mit Eiweißkörpern gemacht werden, nicht einmal innerhalb einer Gruppe, wie sie zum Beispiel die Cephalosporinantibiotika darstellen.

Wasserstoffionenkonzentration

Eine Änderung der Wasserstoffionenkonzentration wie Acidose oder Alkalose, kann bei Säuren oder Basen, die ihren pk_a-Wert um 7 haben zu einer beträchtlichen Erhöhung des freien Anteils führen (16). Aus einer Änderung der Wasserstoffionenkonzentration resultiert eine Änderung der Konfiguration von Albumin (29), die die Proteinbindungsfähigkeit beeinflussen kann.
KRIEGLSTEIN (31) untersuchte die Abhängigkeit der Promazin-Albumin-Bindung von der Wasserstoffionenkonzentration und fand einen steilen Anstieg der Bindung im medizinisch interessanten Bereich von pH 7 bis 7,8. Dagegen teilte SCHOLTAN (53) mit, die in vivo, unter pathologi-

schen Verhältnissen möglichen Schwankungen der Wasserstoffionenkonzentration seien zu geringfügig, als daß sie die Eiweißbindung signifikant beeinflussen würden.

Temperatur

SCHOLTAN und SCHMID (54, 55) berichteten, die Eiweißbindung von Penicillinen und Tetracyclinen nehme mit ansteigender Temperatur ab. DAVIS (13) sprach von einem geringen Einfluß der Temperatur auf die Bindung. Die bei Zimmertemperatur erhaltenen Ergebnisse entsprächen denen bei Körpertemperatur. JUNGE (25) fand bei Ultrafiltrationsversuchen und Temperaturänderungen zwischen 4 und 37 °C keine Veränderung der Eiweißbindung.

Art des Proteins

Es bestehen Unterschiede zwischen den Serumproteinen der einzelnen Tierarten. Der freie Anteil von Cloxacillin wird fünfmal größer in Pferdeserum bestimmt, als in menschlichem Serum (49). Bindungsstudien müssen mit menschlichem Serum, wenn nicht im Menschen, durchgeführt werden (65), da es kein Labortier gibt, dessen Serumbindungseigenschaften mit denen des Menschen übereinstimmen. Das Bindungsvermögen für Penicillin wurde im Serum von allen Versuchstieren geringer gefunden, als im Menschen (53). Die Ursachen dafür sind in Unterschieden von Protein- und Albuminkonzentration zu suchen, sowie in verschiedenen Primär-, Sekundär- und Tertiärstrukturen der bindenden Proteine. Bindende Proteine sind überall im Organismus vorhanden. Dazu zählen Albumin, Globuline, Hämoglobin, Muskelproteine und intrazelluläre Eiweiße. Wenn auch die Bindung an Muskelproteine zum Teil geringer ist als die an Plasmaproteine, so kommt ihr, wegen der erheblich größeren Masse der Muskelproteine quantitativ eine höhere Bedeutung zu.

Wenn die Eiweißbindung einer Substanz, die an Plasmaproteine gebunden war, von 90 % auf 85 % sinkt, so nimmt die Konzentration des freien Anteils im gesamten Wasserraum des Körpers um 3,7 % zu. War die Substanz jedoch an Muskelproteine gebunden, beträgt die Zunahme des freien Anteils 25 % (16). Besondere Aufmerksamkeit ist der geringeren Proteinbindung beim Neugeborenen zu schenken, die zum Teil für seine verminderte Toleranz Arzneimitteln gegenüber verantwortlich ist (31).
Keines der von KUNIN (32) untersuchten Penicilline wurde von Albumin so ausgiebig gebunden, wie von Serum. Dies ist ein Hinweis darauf, daß zur Bindung von Penicillinen auch andere Serumfraktionen in der Lage sind.

Konzentration des Proteins

Das Ausmaß des Wirkungsverlustes durch Proteinbindung hängt von der Konzentration und der Beschaffenheit des Eiweißes ab (1). Bei Benzylpenicillin besteht eine lineare Beziehung zwischen dem prozentualen Anteil an gebundenem Penicillin und dem Logarithmus der Plasma-Eiweiß-Konzentration (64). Zwar steigt die Bindung von Antibiotika mit zunehmender Eiweißkonzentration im Plasma, wie SCHOLTAN (53) für Penicillin beschreibt, jedoch führt umgekehrt ein Absinken der Proteinkonzentration im Serum auf die Hälfte keineswegs zu einer hälftigen Verminderung des gebundenen Anteils. Dieser nimmt nur wesentlich weniger ab (53).
In vivo kommt eine Steigerung des freien Anteils eines Pharmakons infolge gesunkenen Proteingehaltes nur selten in Frage, da größere Veränderungen der Proteinbindung erst bei einem Absinken des Plasmaproteinspiegels auf die Hälfte (16) vorkommen. WIRTH (68) gibt für einen Abfall der Eiweißbindung als Grenze weniger als 3 g/100 ml Albumin an.

Ein Anstieg des gebundenen Anteils des Cephalothin mit steigender Proteinkonzentration im Serum ist unverkennbar. Allerdings spielt dieser Anstieg bei Patienten mit normalem Bluteiweißgehalt keine so bedeutende Rolle, als daß eine Berücksichtigung sinnvoll erschiene.
Bedeutung gewinnt die Abhängigkeit der Proteinbindung von der Eiweißkonzentration, wenn Substanzen, die im Blut hochgradig an Eiweiß gebunden sind, direkt in Körperflüssigkeiten gebracht werden mit geringem Gesamteiweiß, zum Beispiel in Transsudate bei Peritonitis (Proteingehalt circa 2,5 g/100 ml) oder in Liquor (Proteingehalt 5 bis 45 mg/100 ml). Hier ist ein erheblich höherer Anteil an freier Substanz zu erwarten.

Inkubationszeit

JUNGE (25) fand bei Experimenten zur Adsorption von Carbenicillin an Serumeiweißkörper keinen Einfluß der Inkubationszeit, die er von 30 bis 165 Minuten variierte, auf die Proteinbindung. ROLINSON und SUTHERLAND (49) berichten von einer Einstellung des Gleichgewichts zwischen freiem und gebundenem Penicillin innerhalb der ersten acht Minuten, nachdem Serum zu einer Antibiotikumlösung gegeben worden war. Ausführlich widmeten sich WATERMAN, SCHARFENBERGER und RAFF (66) der zeitlichen Abhängigkeit der Proteinbindung von Cephalosporinantibiotika in Hundeserum, was die Übertragbarkeit der Ergebnisse allerdings einschränkt. Cephaloridine wurde in 10 Minuten zu 5 % gebunden und in 20 Minuten zu 10 %, dem Maximalwert. Cephalothin erreichte eine maximale Eiweißbindung von 40 % nach 30 Minuten, wobei nach 10 Minuten erst 12 % gebunden waren. Cefazolin, nach 10 Minuten zu 6 %, nach 20 Minuten zu 24 % gebunden, erreichte seine maximale Eiweißbindung von 80 % erst nach 50 Minuten. Bindung von Cephalosporinen und auch anderen Antibiotika ändert sich nach einer Stunde nicht mehr (25, 49, 66).

Allerdings kann der Anteil des freien Chemotherapeutikums fälschlicherweise zu hoch ermittelt werden, wenn die Untersuchungen durchgeführt werden, ehe die maximale Proteinbindung erfolgt ist (66).

Veränderungen der Eiweißbindung in Gegenwart anderer Substanzen:

Für eine gute Wirkung als Substituent reicht eine hohe Serumbindung allein nicht aus, da die sterischen Anforderungen für die Komplexbildung von Penicillin mit Serumproteinen für jedes chemisch verwandte Präparat leicht unterschiedlich sind, und die Orte der Serumbindung vielleicht nicht identisch sind für verschiedene Substanzen. Auffallend ist jedoch der Grad der Überlappung.
Ungeklärt ist, ob die Substituenten ihre Wirkung direkt an den Orten der Penicillinbindung ausüben, oder ob sie durch Anlagerung in der Nachbarschaft sterisch behindernd wirken.
Diese Methode, den Serumspiegel eines Antibiotikums zu erhöhen, war nicht verbreitet, da der Verdrängungseffekt durch eine Schwellung des Albuminmoleküls, die ein gesteigertes Bindungsvermögen nach sich zieht, überlagert werden konnte (31). Auch stieg der Serumspiegel nicht immer an, da aus der geringeren Eiweißbindung ein größeres Verteilungsvolumen resultiert. Außerdem kann die renale Ausscheidung beschleunigt werden, da die filtrierbare Fraktion größer geworden ist. Begrenzend wirkte auch die Metabolisierung der Substituenten, die zu weniger substitutionsfähigen Abbauprodukten führen kann (32).
Ließ sich aber der freie Anteil im Serum steigern, so traten, neben der erwünschten Hauptwirkung in verstärktem Maße auch unerwünschte Nebenwirkungen auf. Verdrängung des Substituenten und gesteigerte Eiweißbindung wurden ebenfalls beschrieben (31). Besondere Gefahren erwachsen

daraus, daß auch körpereigene Substanzen, wie Hormone oder Bilirubin aus ihrer Bindung an Eiweiß freigesetzt werden können und dann in unphysiologischen Konzentrationen anfallen.

Bedeutung der Eiweißbindung:

Eiweißbindung und Wirksamkeit in vitro

Der an Eiweiß gebundene Anteil eines Antibiotikums ist antibakteriell inaktiv. Die Aktivität im Serum entspricht allein der des freien, ungebundenen Antibiotikums (6, 7, 10, 13, 18, 33, 35, 36, 47, 54, 61). Darauf weist die enge Beziehung zwischen der Verminderung von Aktivität im Serum und dem experimentell ermittelten Anteil an eiweißgebundenem Medikament hin (49).
Der nachteilige Effekt der Serumproteinbindung ist nicht linear, sondern gewinnt zunehmend an Bedeutung im Bereich von über 70 % Eiweißbindung.
Allerdings darf bei Antibiotika und Sulfonamiden eine hohe Eiweißbindung nicht unbedingt mit in vivo geringer Wirksamkeit gleichgesetzt werden. Gerade das Gegenteil kann der Fall sein (31).

Eiweißbindung und Diffusion

Nur die freie Fraktion eines Antibiotikums kann aus der Blutbahn in interstitielle oder andere Körperflüssigkeiten diffundieren. Der Verlust von freiem Antibiotikum aus dem Serum führt zur Freisetzung von gebundenem Antibiotikum, um ungefähr das Gleichgewicht zwischen beiden zu halten. Ebenso stellt sich ein Gleichgewicht zwischen dem freien Antibiotikum in Blutbahn und Interstitium ein. Die Konzentration an freiem Antibiotikum ist im intra- und im extravasalen Raum praktisch gleich (65). Der Grad der Proteinbindung eines Medikaments be-

einflußt seine Verteilung, Erhaltung und Ausscheidung (60, 61). Das Penetrationsverhältnis wird weder durch die Höhe noch durch die Dauer der maximalen Serumkonzentration beeinflußt.
Serumeiweiß kann aus der Blutbahn in die Gewebeflüssigkeit übertreten und das an das Eiweiß gebundene Chemotherapeutikum mitnehmen. So können stark an Eiweiß gebundene Stoffe ins Gewebe gebracht werden (54). Dies kommt meist bei Entzündungen vor. Die extravasal höhere Antibiotikumkonzentration ist therapeutisch erwünscht. Allerdings liegt die Annahme nahe, daß das ausgetretene Antibiotikum antibakteriell inaktiv bleibt, da es sich auch im Gewebe um die proteingebundene Form handelt (64).
VERWEY und WILLIAMS (64) zeigten, daß in der Lymphe, die in der Zusammensetzung der extrazellulären Flüssigkeit entspricht, weniger frei verfügbare Substanz vorliegt, wenn es sich um ein hochgradig gebundenes Antibiotikum handelt. Die freie Substanz bestimmt die Diffusionsrate aus dem Blutstrom. Als einzige bedeutsame Variable für das Ausmaß der Diffusion ergab sich der Grad der Eiweißbindung (4, 50). Von hochgradig proteingebundenen Substanzen wurden auch geringere Konzentrationen in Herz, Gehirn, Muskel und Niere gemessen (32). Besondere Bedeutung kommt der Proteinbindung zu bei der Passage biologischer Barrieren, wie der Blut-Hirn- und der Blut-Liquor-Schranke. Sie determiniert den Blut-Liquor-Gradienten des Antibiotikums neben Faktoren wie Molekülgröße, Lipoidlöslichkeit, Ionisierungsgrad der Substanz bei der Wasserstoffionenkonzentration von Blut, Liquor und Gehirn. Allerdings beruht der Schrankeneffekt nicht nur auf einer Begrenzung des Zugangs zu diesen Räumen, sondern auch auf spezifischen aktiven Transportmechanismen nach außen (15).
Für die Verteilung zwischen Blut und Synovia erwies sich ebenfalls die Proteinbindung als entscheidende Größe.

Das stärker gebundene Cloxacillin zeigte in der Synovia nur 22 % der Aktivität im Serum, während beim gering gebundenen Ampicillin 70 % der Serumaktivität in der Gelenkflüssigkeit auftraten. Die Spiegel von freiem Cloxacillin in Serum und Synovia lagen nahe beieinander (23).
Probenicid konkurriert mit Penicillin um Aufnahme ins Gehirn genauso, wie es um die Eiweißbindung konkurriert, ein bei Meningitis unerwünschter Effekt (15).
Ein Pharmakon-Protein-Komplex kann biologische Menbranen nur schlecht passieren, da er 200 bis 300 mal größer als das nicht gebundene Pharmakonmolekül und weniger lipophil ist. Er gelangt nicht an einen Wirkort der jenseits solcher Membranen liegt und ist unwirksam. Da er auch nicht zu den intrazellulär gelegenen Enzymsystemen gelangt, erfolgt keine Inaktivierung durch biochemischen Umbau (16). Mit steigender Proteinbindung erfolgt eine Abnahme der Metabolisierung eines Arzneimittels (31). Ein Zusammenhang zwischen den Serumspitzenspiegeln und der Proteinbindung verschiedener Penicilline und Cephalosporine nach intravenöser Dauerinfusion wurde nicht gefunden. Vermutlich haben renale oder hepatische Mechanismen die Wirkung der Proteinbindung aufgehoben (3). Antibiotika werden nämlich, ähnlich wie viele andere Arzneimittel, von der Leber aufgenommen und können dort konjugiert werden; sie können dann wieder in den Blutkreislauf abgegeben oder in die Galle ausgeschieden werden. Auch intrazelluläre komplexbildende Proteine scheinen einen wichtigen Einfluß auf die Pharmakokinetik von Antibiotika auszuüben (36).
Die Ausscheidung durch glomeruläre Filtration ist fast ausschließlich dem freien Medikament vorbehalten. Jedoch ist die aktive tubuläre Sekretion so wirksam, daß auch hochgradig proteingebundene Medikamente rasch ausgeschieden werden können (34). Eine Einschränkung der tubulären Sekretion durch die Eiweißbindung erfolgt nicht (31).

Der an Proteine gebundene Anteil des Pharmakons ist also sein Umschlagplatz im Körper, verursacht eine Depotwirkung und ermöglicht eine intravenöse Applikation von Substanzen, die sonst im Blut, wegen ihrer geringen Wasserlöslichkeit ausfallen würden (16).

Freier und gebundener Anteil des Gewebespiegels

Für die Heilwirkung ist die Konzentration des freien Chemotherapeutikums maßgebend (22, 54). Obwohl die Penicillin-Konzentrationen in der interstitellen Flüssigkeit des Gehirns niedrig sind, fällt eine gute therapeutische Wirksamkeit in dieser proteinarmen Flüssigkeit auf (61). Die geringe Penicillinbindungsfähigkeit der Gewebeeiweißkörper führt dazu, daß der prozentuale Anteil an freiem Penicillin im Gewebe wesentlich größer ist als im Serum. Ursache dafür sehen SCHOLTAN und SCHMID (54) im geringeren Proteingehalt der interstitiellen Flüssigkeit (circa 5,9 %), sowie in einer Anzahl von Enzymen und Eiweißkörpern, die im Serum nicht oder in geringerer Konzentration vorkommen. Auch Zellmetabolite, die von Proteinen gebunden werden und im Serum nicht auftreten, werden genannt (64). Selbst wenn man die Proteinkonzentration des Plasmas rechnerisch oder durch Verdünnen der Lymphe angleicht, ist die Bindungskapazität des Plasmas höher, obschon die Proteine der Lymphe von denen des Plasmas abgeleitet sind. Trotzdem könnte man die Konzentration des freien Penicillins im Plasma als praktische und zuverlässige Schätzung der freien Penicillinkonzentration in der interstitiellen Flüssigkeit betrachten (64).

Eiweißbindung und Therapie

Für die Therapie muß das Antibiotikum am Ort der Infektion, meistens außerhalb der Blutbahn, hinreichend kon-

zentriert und hinreichend lange vorliegen (53, 54). Wichtiger als die Höhe eines kurzfristigen Konzentrationsgipfels im Serum ist, wann und über welche Zeit die benötigten MHK-Werte (MHK = Minimale Hemmkonzentration) am Wirkort erreichbar sind (17). Aus noch so hohen Blutspiegeln lassen sich keine Schlüsse auf lokale Wirksamkeit ziehen (21). Beweisend sind nur Organkonzentrationen (42).
Genaue Bestimmungen der Proteinbindung in vitro erlauben die Berechnung der Konzentrationen des freien Medikaments im Serum. So kann man Übereinstimmung erzielen zwischen der Konzentration an ungebundenem Medikament, die in vivo nötig ist und der in vitro ermittelten minimalen Hemmkonzentration (33), die möglichst übertroffen werden sollte (34).

Eiweißbindung bei Erkrankungen

KRIEGLSTEIN (31) zitiert unter anderem Fälle von herabgesetzter Proteinbindung für Sulfonamide bei Leberzirrhose und Nephrose (Scholtan 1961). Gesteigertes Bindungsvermögen für Sulfonamide sei bei Patienten mit chronischer Lungentuberkulose aufgetreten, (Pagnani et al., 1963). Bei Patienten mit Analbuminämie sei zunächst ein Schwund von Kongorot aus dem Kreislauf drei- bis viermal so schnell, wie bei gesunden Probanden erfolgt. Diese Erscheinung habe sich jedoch nach mehrtägiger Infusion normalisiert (Bennhold, 1956; Ott, 1957).
KUNIN (35) berichtet von erheblich verminderter Proteinbindung, besonders für anionische Substanzen, bei Urämie, Hyperbilirubinämie, Hypoalbuminämie, Nephrotischem Syndrom und schwerem Leberversagen.
Verminderung der Eiweißbindung von Cefazolin bei Patienten mit Urämie von 84 % auf bis zu 62 % beschrieben CRAIG und Mitarbeiter (12).

Zusammenstellung von Literaturangaben zur Eiweißbindung von Cephalosporinantibiotika

Eiweiß-bindung %	Methode der Bestimmung Bemerkungen	Quelle (Jahr)
	C e p h a l o t h i n	
38	vom Hersteller zitiert in	38 a (1963)
40	Ultrafiltration bei 20 µg/ml gepooltes Hundeserum	66 (1974)
47	keine Angabe; zitiert in	27 (1975)
50-79	zitiert in Antibiotikafibel	19 (1975)
60-70	keine Angabe	56 (1973)
62-79	keine Angabe, außer "im Blut"	7 (1975)
65	modifizierte Ultrafiltrations-methode mit Unterdruck bei 37 °C und pH 7.4 in 100 % Serum	26 (1968)
65	Ultrafiltration; 30 µg/ml	28 (1973)
68	Gleichgewichtsdialyse; 50 µg/ml	6 (1973)
70	keine Angabe (Lehrbuch)	16 (1975)
79	siehe unter "Cefazolin"	40 (1973)
	C e p h r a d i n	
6	Ultrafiltration, "nach thera-peutischen Dosen"	20 (1975)
6	keine Angabe	56 (1973)
10,2 - 47,6	Gleichgewichtsdialyse, Ultra-filtration, Ultrazentrifuga-tion; 25 bis 100 ug/ml	27 (1975)
0-20	Ultrafiltration Antibiotika-Fibel	19 (1975)

Eiweiß-bindung %	Methode der Bestimmung Bemerkungen	Quelle (Jahr)
	C e f a z o l i n	
58-82	keine Angabe	37 (-)
63-73	keine Angabe	38 b (1974)
65-84	keine Angabe	7 (1975)
65-100	Gleichgewichtsdialyse, Ultrazentrifugation, Ultrafiltration; 10-100 µg/ml	30 (1975)
73	Bestimmung durch Berechnung der Wirksamkeit von Cefazolin aus der durchschnittlichen MHK nach der "tube dilution method" mit "trypticase soy broth" und 100 % Serum;	40 (1973)
74	keine Angabe	56 (1973)
80	Ultrafiltration mit Visking Membran bei 20 µg/ml und Unterdruck; Dauer 20 Minuten; gepooltes Hundeserum	66 (1974)
81	Gleichgewichtsdialyse; 50 µg pro ml (bei gleicher Methode und Konzentration ergab sich eine Bindung von 86,7 % (30).	6 (1973)
83,9	Gleichgewichtsdialyse und "cup-plate method"; Bestimmung im Blut einer Versuchsperson nach Dosis von 500 mg	12 (1973)
86	Ultrafiltration; 30 µg/ml; gepooltes Humanserum	28 (1973)

Eiweißbindung %	Methode der Bestimmung Bemerkungen	Quelle (Jahr)
	Cephacetril	
23-34	keine Angabe	41 (1974)
25	zitiert in Antibiotikafibel	19 (1975)
35	"Methode nach Rolinson" zitiert in	39 (1973)
	Cephalexin	
13-19	modifizierte Ultrafiltrationsmethode mit Unterdruck bei 37 °C und pH 7.4 in 100 % Serum; 10 µg/ml	26 (1968)
15	siehe Cefazolin	57 (1973)
15	Ultrafiltration, Humanserum; 30 µg/ml	28 (1973)
20	keine Angabe (Lehrbuch)	16 (1975)
34	Gleichgewichtsdialyse; 50 µg/ml	6 (1973)
38-50	Agardiffusionstest; Humanserum; 5 µg/ml	43 (1969)
	Cephamandol	
27-33	Aktivitätsverlust im Serum, bestimmt aus Vergleich von Standardkurven in NaCl-Puffer und in Serum bei 0,6 bis 10 µg/ml Cephamandol	67 (1971)

V. Zusammenfassung

Die Eiweißbindung der sechs Cephalosporin-Antibiotika Cephalothin, Cephradin, Cefazolin, Cephacetril, Cephalexin und Cephamandol in Humanserum wurde bei zwei verschiedenen Serumkonzentrationen bestimmt.
Die Unterscheidung des an Serumproteine gebundenen Anteils der Antibiotika erfolgte mittels Gelfiltration im Gleichgewichtszustand und unter den Bedingungen der Frontalanalyse, sowie durch Membranultrafiltration mit Stickstoffüberdruck und durch Zentrifugation.
Die Ergebnisse dieser Untersuchung wurden mit denen anderer Autoren verglichen. Die vier hier verwendeten Verfahren wurden untereinander und mit den in der Literatur zitierten Methoden in Beziehung gesetzt.
Die Bestimmung der antibakteriellen Aktivität erfolgte im Agardiffusionstest unter Verwendung von Bacillus subtilis ATCC 6633, als Testmikroorganismus.
Auch die direkte Inaktivierung von Cephalosporin-Antibiotika durch Humanserum, ihre Eigenschaften bei der Spektralphotometrie und der Einfluß, der Zusammensetzung des Nähragars auf die Hemmhofdurchmesser wurde untersucht.
Mit steigender Antibiotikumkonzentration im Serum nahm die Eiweißbindung zu. Bei Cefazolin wurde eine Abnahme der Eiweißbindung bei Verdünnung des Serums festgestellt. Starke Absorptionsphänomene an Sephadex traten bei Cephacetril, geringere bei Cephalothin und Cephradin auf. Die sonst zuverlässigen Methoden lieferten bei Cephalexin zweifelhafte Ergebnisse.
Für die Komplexbildung von Cephalothin mit Serumproteinen wurde bei der Untersuchung von beiden Konzentrationsstufen mit allen Methoden ein Prozentsatz der Bindung von 34 bis 63 % ermittelt. Für die Proteinbindung von Cephradin ergaben sich 10 bis 23 %. Cefazolin war zu 32 bis 65 %,

Cephacetril zu 8 bis 23 %, Cephalexin zu 4 bis 20 % und Cephamandol zu 31 bis 78 % an Serumproteine gebunden.
Anreicherungen in der Membran finden sich bei Cephalothin (Diaflo), bei Cephamandol (Diaflo und Centriflo), sowie bei Cefazolin in geringem Umfang (Centriflo). Auch bei der Untersuchung von Cephalexin traten mehrfach Anreicherungen bei den Membranultrafiltrationen auf. Sie ließen sich weder durch den Wechsel des Filtertyps, noch durch Wechsel des Lösungsmittels vermeiden. Bei der Membranultrafiltration von Cephradin fanden sich Anreicherungen von antibakterieller Aktivität im Ultrafiltrat. Sie ließen sich beim Centriflo-Verfahren durch Äquilibrierung der Membran vermeiden. Beim Diaflo-Versuch wurden Anreicherungen in einem Falle jedoch erst durch die Äuilibrierung hervorgerufen.
Die Zusammensetzung des Nähragars mußte streng konstant gehalten werden, um vergleichbare Hemmhofdurchmesser in allen Versuchsreihen zu erhalten.
Die photometrische Bestimmung von Cefazolin- und Cephacetril-Konzentrationen in Puffer und Serum erwies sich als durchführbar. Wegen starker Eigenabsorption der physiologischen Urinbestandteile war die der Antibiotika nicht mehr erkennbar.
Die Proteinbindung von Cephalothin 1o µg/ml im Blut von Patienten mit 5,0 bis 10,1 g/100 ml Gesamteiweiß, bestimmt mittels Centriflo-Membranultrafiltration, schwankte zwischen 46 und 77 % (Mittelwert 65 %), wobei ein Anstieg des gebundenen Anteils parallel zum Anstieg der Gesamteiweißkonzentration erfolgte.
Es wird versucht, einen Überblick über das Schrifttum zur Eiweißbindung von Antibiotika zu geben. Neben den biochemischen Grundlagen der Eiweißbindung werden besonders die sie beeinflußenden Faktoren wie Inhibitoren und Konkurrenten, Art und Struktur des Antibiotikums, Wasserstoffionenkonzentration, Temperatur, Konzentration und Art der

Proteine, sowie Einfluß der Inkubationszeit diskutiert. Auf die Grundlagen der zu Untersuchungen der Komplexbildung mit Eiweißkörpern verwendeten Membranultrafiltrationen und die dabei möglichen Fehler wird besonders eingegangen. Es wird zusammenfassend dargestellt, wie die Bedeutung der Eiweißbindung für Toxizität, Wirkung, Verteilung, Diffusion, Gewebespiegel, intrazellulären Umsatz, Metabolismus und Exkretion von Antibiotika in der Literatur beurteilt wird.

VI. Literatur

1) ADAM, D.

Der Einfluß von Humanserum auf die In-vitro-Aktivität von Cefazolin
Infection 2, Supplement 1, 24-27 (1974)

2) AMICON

a) Anleitung und Katalog; Publikation Nr. 426 G der Firma Amicon GmbH, 5810 Witten/Ruhr
b) Instructions Diaflo Ultrafilters; Publication 1-101 E from Amicon, Lexington, USA (1974)

3) BARZA, M., L. WEINSTEIN

Some Determinants of the Distribution of Penicillins and Cephalosporins in the Body, Practical and Theoretical Considerations
Ann.N.Y.Acad.Sci. 235, 613-620 (1974)

4) BARZA, M., T. SAMUELSON, L. WEINSTEIN

Penetration of Antibiotics into Fibrin Loci in Vivo III. Comparison of Nine Antibiotics: Effect of Dose and Degree of Protein Binding
J.Infect.Dis. 129, No. 1, 66-72 (1974)

5) BENNHOLD, H., E. KYLIN, S. RUSNYAK

Die Eiweißkörper des Blutplasmas Dresden 1938, Theodor Steinkopff, 230-303

6) BERGERON, M.G., J.L. BRUSH, M. BARZA, L. WEINSTEIN

Bactericidal Activity and Pharmacology of Cefazolin
Antimicrob. Ag. Chemother. 4, No. 4, 396-401 (1973)

7) BOEHRINGER

Arztprospekt für Gramaxin^{R},
Firma Boehringer Mannheim GmbH,
Mannheim (1975)

8) BLATT, W.F., S.M. ROBINSON, H.J. BIXLER

Membrane Ultrafiltration: The Diafiltration Technique and its Application to Microsolute Exchange and Binding Phenomena
Anal. Biochem. 26, 151-173 (1968)

9) BURKE, C.W.

Accurate Measurement of Steroid-Protein Binding by Steady-State Gelfiltration
Biochim. Biophys. Acta 176, 403-413 (1969)

10) COLVILLE, J.M., E.L. QUINN

Observations cocerning protein interference and pharmacodynamic behaviour of nine penicillins
Antimicrob. Ag. Chemother. 1961, 600-610 (1961)

11) COOPER, P.F., C.G. WOOD

Protein binding of small molecules: new gel filtration method
J. Pharm. Pharmac. 20 Suppl. 150 S-156 S (1968)

12) CRAIG, W.A., P.G. WELLING, TH. C. JACKSON, C.M. KUNIN

Pharmacology of Cephazolin and Other Cephalosporins in Patients with Renal Insufficiency
J. Infect. Dis. 128 Suppl. S 347- S 353 (1973)

13) DAVIS, B.D.

The binding of sulfonamide drugs by plasma proteins. A factor in determining the distribution of drugs in the body
J. Clin. Invest. 22, 753-762 (1943)

14) FISCHER, J., O. JARDETZKY

Nuclear Magnetic Relaxion Study of Intermolecular Complexes. The Mechanism of Penicillin Binding to Serum Albumine
J. Amer. Chem. Soc. 87, 3237-3244 (1965)

15) FISHMAN, R.A.

Blood-Brain and CSF Barriers to Penicillin and Related Organic Acids
Arch. Neurol. 15, 113-124 (1966)

16) FORTH, W., D. HENSCHLER, W. RUMMEL (Herausgeber)

Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie
Zürich 1975, 1. Auflage, Wissenschaftsverlag
Bibliographisches Institut

17) FREY, R. (Herausgeber)

Antibiotika - ein Leitfaden für die Therapie in Praxis und Klinik
2. Auflage, München 1974, Aesopus Verlag

18) GOLDSTEIN, A.

The Interactions of Drugs and Plasma Proteins
Pharmacol. Review 1, 102-165 (1965)

19) HEILMEYER, W.

Antibiotika-Fibel
4. Auflage, Stuttgart 1975, Thieme-Verlag

20) von HEYDEN, SQUIBB

Arztprospekt für Sefril^{R} der Firma von Heyden-Squibb, München (1975)

21) HIERHOLZER, G., G. LINZENMEIER, R. KLEINING, G. HÖRSTER

Vergleichende Untersuchungen über die Konzentrationen von Cephacetril und Cephalothin im normalen und chronisch entzündeten Knochengewebe
Arzneim.-Forsch. 24, 1501-1504, Nr. 9 b (1974)

22) HOCHHEUSER, W., F. MARGUTH, M. MÜLLER-BARDORFF, K. SCHWARZ, P.C. SCRIBA, H. THIELE

Diagnostische Bedeutung der Proteinbindung von Plasmacortisol, bestimmt durch Dextrangelfiltration
Klin. Wschr. 47, Heft 6, 300-309 (1968)

23) HOWELL, A., R. SUTHERLAND, G.N. ROLINSON

Effect of protein binding on levels of ampicillin and cloxacillin in synovial fluid
Clin. Pharmac, Ther. 16, No. 1, part 2, 251-256 (1972)

24) HUMMEL, J.P., W.J. DREYER

Measurement of protein binding phenomena by gel filtration
Biochim. Biophys. Acta, 63, 530-532 (1962)

25) JUNGE, O.

Dünnschichtchromatographische Auftrennung der Antibiotika Carbenicillin, Polymyxin, Capreomycin und Untersuchungen zur Bestimmung ihrer Adsorption am Serumeiweißkörper mit Hilfe der Gelfiltration
Dissertation, Tübingen (1971)

26) KIND, A.C., D.G. KESTLE, H.C. STANDIFORD

Laboratory and Clinical Experience with Cephalexin
Antimicrob. Ag. Chemoth., 361-365 (1968)

27) KIOSZ, D., C. SIMON, V. MALERCYK

Die Plasmaeiweißbindung von Clindamycin, Cephazolin und Cephradin bei Neugeborenen und Erwachsenen.
Klin. Päd. 187, 71-80 (1975)

28) KIRBY, W.M.M., C. REGAMEY

Pharmacokinetics of cefazolin compared with four other cephalosporins
J. Infect. Dis. 128, Supplement, 341-346 (1973)

29) KLOTZ, J.M., J. AYERS

Protein interactions with organic molecules
Discuss. Faraday Soc. 13, 189-196 (1953)

30) KRADOLFER, F., W. SACKMANN, O. ZAK, H. BRUNNER, R. HESS, E.A. KONOPKA, J. GELZER

Cephacetrile: Chemotherapy and Toxicology in Laboratory Animals
Arzneim.-Forsch. 24, Nr. 9 b, 1459-1462 (1974)

31) KRIEGLSTEIN, J.

Zur Plasmaproteinbindung von Arzneimitteln
Klin. Wschr. 47, Nr. 21, 1125-1130 (1969)

32) KUNIN, C.M.

Inhibitors of penicillin binding to serum proteins
J. Lab. Clin. Med. 65, No. 3, 416-431 (1965)

33) KUNIN, C.M.

Clinical pharmacology of the new penicillins I.: Protein binding
Clin. Pharmacol. Ther. 7, No. 2 166-179 (1966)

34) KUNIN, C.M.

Clinical Significance of Protein Binding of Penicillins
Ann. N.Y. Acad. Sci. 145, 282-290 (1967)

35) KUNIN, C.M.

Blood level measurements and antimicrobial agents
Clin. Pharmacol. Ther. 16, No. 1, part 2, 251-256 (1974)

36) KUNIN, C.M., W.A. CRAIG, M. KORNGUTH, R. MONSON

Influence of Binding on the Pharmacologic Activity of Antibiotics
Ann. N.Y. Acad. Sci. 235, 613-620 (1974)

37) LAPPE

Zolicef^{R}-Arztprospekt der Firma Lappe, Bensberg

38) LILLY

a) Cephalothin^{R}-Arztprospekt der Firma Lilly Gießen (1970)
b) Elzogram^{R}-Arztprospekt der Firma Lilly Gießen (1974)
c) Mandokef^{R}-Arztprospekt der Firma Lilly Gießen (1977)

39) LUSCOMBE, D.K., P.J. NICHOLLS, D.R. OWENS, A.D. RUSSEL

Pharmacokinetic Studies in Animals and Humans of a New Cephalosporin, the Sodium

Salt of 7-Cyanacetyl-amino-cephalesporanic Acid
Arzneim.-Forsch. 24, Nr. 9 b, 1478-1481 (1974)

40) MADHAVAN, T., E.L. QUINN, E. FREIMER, E.J. FISHER, F. COX, K. BURCH, D. POHLOD

Clinical Studies of Cefazolin and Comparison with other Cephalosporins
Antimicrob. Ag. Chemother. 4, No. 5 525-531 (1973)

41) MAURICE, P.N., W. RIESS, A. WELKE, K. AMSON

Cephacetril (C-36 278 Ba), ein neues Antibiotikum aus der Cephalosporinreihe. Pharmakokinetik und klinische Prüfung
Arzneim.-Forsch. 24, Nr. 9 b, 1497-1501 (1974)

42) MEYER-BRUNOT, H.G., C. SCHENK, K. SCHMID, P. SPRING, W. THEOBALD, J. WAGNER

Einige Aspekte zur Pharmakokinetik von Celospor, insbesondere Liquorgängigkeit
Wiener Medizin.Wschr. 45, Suppl. Nr. 27 6-12 (1975)

43) NAUMANN, P.J., J. FEDDER

Mikrobiologie und Pharmakologie von Cephalexin
Int. J. Clin. Pharmacol. Beiheft Oracef, 6-23 (1970) Suppl.

44) OBERZILL, W.

Mikrobiologische Analytik, 1. Auflage
Nürnberg, H. Carl, 1967, 323-287

45) O'CALLAGHAN, C.H., P.W. MUGGLETON

Serum Binding of Penicillins and Cephalosporins in FLYNN, E.H. (Editor) Cephalosporins and Penicillins, Chemistry and Biology, New York, Academic Press, 1972

46) PREUSSER, H.J.

Die Ultrastruktur einiger feinporiger Membranfiltertypen.
Kolloid-Z.u.Z. Polymere 250, 133-141 (1972)

47) QUINN, E.L.

Protein Binding of Semisynthetic Penicillins
Postgraduate Med. Journal, 23-30 (1964)

48) RICK, W.

Klinische Chemie und Mikroskopie, 3. Auflage Berlin, Springer 1974,208-209

49) ROLINSON, G.N., R. SUTHERLAND

The Binding of Antibiotics to Serum Proteins
British J. Pharmacol. 25, 638-650 (1965)

50) RUEDY, J.

The concentrations of penicillins in the cerebrospinal fluid and brain of rabbits with experimental meningitis
Can. J. Physiol. Pharmacol. 43, 763-772 (1965)

51) RYAN, T.M., N.S. HANNA

Investigation of Equilibrium Ultrafiltration as a Means of Measuring Steroid Protein Binding Parameters
Anal. Biochem. 40, 364-379 (1971)

52) SCHOLTAN, W.

Die Bindung der Antibiotika an die Eiweißkörper des Serums: 3. Mitteilung. Theorie und Gesetzmäßigkeit der Eiweißbindung von Antibiotika
Arzneim.-Forsch. 13, 347-360 (1963)

53) SCHOLTAN, W.

Die Bindung der Penicilline an die Eiweißkörper des Plasmas und der Gewebsflüssigkeit
Antibiotica et Chemoth. 14, 53-93 (1968)

54) SCHOLTAN, W., J. SCHMID

Die Bindung der Penicilline an die Eiweißkörper des Serums und des Gewebes
Arzneim.-Forsch. 12, 741-750 (1962)

55) SCHOLTAN, W., J. SCHMID

Die Bindung von Antibiotika an die Eiweißkörper des Serums
Arzneim.-Forsch. 13, 288-294 (1963)

56) SIMON, C., V. MALERCYK, E. BRAHMSTEDT, W. TOELLER

Cefazolin, ein neues Breitspektrum-Antibiotikum
Dtsch. Med. Wschr. 98, 2448-2450 (1973)

57) SIMON, C., F. MÖHLENBECK

Cephazolin-Spiegel im Intra- und Extravasalraum
Adv. Clin. Pharmacol. 8, 96-101 (1974)

58) STEINEMANN, H.G., E.L. DENNY

Reversible Binding of Penicillin to Serum Albumine
Third Intersc. Conf. Antimicrob. Ag. Chemother. Oct. 1963

59) STRATHMANN, H.

Konzentrationsüberhöhung bei Membranfiltrationen
Chem.-Ing.-Techn. 45, Nr. 12, 825-864 (1973)

60) TAN, J.S., A. TROTT, J.P. PHAIR, CH. WATAKUNAKORN

A method for measurement of antibiotics in human interstitial fluid
J. Infect. Dis. 126, 492-497 (1972)

61) TOMPSETT, R., S. SHULTZ, W. MC DERMOTT

The Relation of Protein Binding to the Pharmacology and Antibacterial Activity of Penicillins X, G, Dihydro F and K
J. Bact. 53, 581-595 (1947)

62) ULLMANN, U.

The protein binding of ticarcillin and tobramycin
J. Antimicrob. Chemother. 2, 001-002 (1976)

63) ULLMANN, U.

The binding of isoxazolyl penicillins to human serum proteins
Arzneim.-Forsch. 27, 2136-2138 (1977)

64) VERWEY, W.F., H.R. WILLIAMS jr.

Binding of Various Penicillins by Plasma and Peripheral Lymph Obtained from Dogs
Antimicrob. Ag. Chemother. 484-491 (1962)

65) WATERMAN, N. G.

Antibiotics and serum protein binding
Surg. ob. gyn. 244-245 (1974)

66) WATERMAN, N., L. SCHARFENBERGER, M.J. RAFF

Rate of Binding of Antibiotics to Canine Serum Protein

Antimicrob. Ag. Chemother. 5, Nr. 3, 294-295 (1974)

67) WICK, W.E., PRESTON, D.A.

Biological Properties of Three 3-Heterocyclic-thiomethyl-Cephalosporin Antibiotics
Antimicrob. Ag. Chemother. 1, No. 3, 221-234, (1972)

68) WIRTH, K.

Pharmakokinetik von Cephalosporinen
Inn. Med. 2, 41-47 (1975)

Ich danke Herrn Professor Dr. med. R.-E. Bader für die Möglichkeit im Hygiene-Institut zu arbeiten. Herrn Professor Dr. med. U. Ullmann möchte ich besonders danken für das Thema, seine Einführung in die Arbeitsmethoden und seine freundliche und hilfreiche Unterstützung bei der Durchführung der Arbeit.
Frl. H. Petruschka danke ich für die Anfertigung der photographischen Abbildungen.

L e b e n s l a u f

Am 27. August 1953 wurde ich, Frido Eberhard Mütsch, als Sohn des Hauptlehrers Heribert Mütsch und seiner Ehefrau Gertrud, geborene Albus, Lehrerin, in Aalen/Württemberg geboren.
Von 1960 - 1964 besuchte ich die Grundschule "Alte Gewerbeschule" in Aalen, dann das Schubart-Gymnasium in Aalen, an dem ich 1972 die ordentliche Reifeprüfung ablegte.
Zum Wintersemester 1972/73 nahm ich an der Universität Tübingen das Medizinstudium auf. Die ärztliche Vorprüfung legte ich 1974, den 1. Abschnitt der ärztlichen Prüfung 1975 und den 2. Abschnitt der ärztlichen Prüfung 1977 vor dem Landesprüfungsamt für Medizin und Pharmazie Baden-Württemberg in Reutlingen ab.
Vom 1. Oktober 1977 bis 31. September 1978 nahm ich am Katharinenhospital Stuttgart, Akademisches Lehrkrankenhaus der Universität Tübingen, am klinisch-praktischen Unterricht in den Fächern Chirurgie, Innere Medizin und Anästhesiologie teil.
Den 3. Abschnitt der ärztlichen Prüfung legte ich ab am 16. Oktober 1978.